

Etablierung eines infektiösen Minigenomsystems für Marburg Virus basierend auf Virus-ähnlichen Partikeln

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jörg Wenigenrath
aus Wuppertal

Marburg/Lahn, 2008

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am ...16.02.2009.....
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach
Zweitgutachter: Prof. Dr. Stephan Becker

Tag der mündlichen Prüfung:06.03.2009.....

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	1
1.1	Taxonomie und Epidemiologie.....	1
1.2	Klinik und Pathologie des Marburg Virus	5
1.3	Morphologie und Genomstruktur	8
1.4	Proteine des Marburg Virus	9
1.4.1	NP	9
1.4.2	VP35	9
1.4.3	VP40	10
1.4.4	GP	11
1.4.5	VP30	12
1.4.6	VP24	12
1.4.7	L	13
1.5	Transkription und Replikation des MARV	13
1.6	Reverse genetische Systeme für Filoviren	15
1.7	Fragestellung:.....	18
2	Material	19
2.1	Geräte	19
2.2	Chemikalien	20
2.3	Verbrauchsmaterialien	21
2.4	Kits.....	22
2.5	Puffer und Lösungen.....	22
2.5.1	Puffer.....	22
2.5.2	Lösungen.....	24
2.6	Wachstumsmedien	24
2.6.1	Wachstumsmedien für Bakterien.....	24
2.6.2	Wachstumsmedien für Säugerzellen.....	25
2.7	Nukleinsäuren und Nukleotide	25
2.7.1	Nukleinsäuren	25
2.7.2	Nukleotide.....	25
2.8	DNA-Oligonukleotide.....	26
2.9	Vektoren und rekombinante Plasmide	27
2.10	Proteine	27
2.10.1	Enzyme	27
2.10.2	Primäre Antikörper	28
2.10.3	Sekundäre Antikörper	28
2.10.4	Proteinmarker.....	28
2.11	Radioaktiv markierte Substanzen	28
2.12	Zellen und Viren	29
2.12.1	Prokaryotische Zellen	29
2.12.2	Eukaryotische Zellen	29
2.12.3	Viren	29
3	Methoden	30
3.1	Molekularbiologische Methoden	30

3.1.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen	30
3.1.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA und Visualisierung	31
3.1.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	32
3.1.4	Restriktionsendonukleasebehandlung von DNA	33
3.1.5	Reinigung von DNA	33
3.1.6	Dephosphorylierung linearisierter DNA.....	34
3.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren	34
3.1.8	Transformation von Plasmiden in Z-kompetente XL-1 Blue Zellen	35
3.1.9	Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterienzellen	35
3.1.10	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab.....	36
3.1.11	Plasmidpräparation im großen Maßstab	36
3.1.12	Konzentrationsbestimmung von DNA mit dem Photometer	36
3.1.13	Ortsgerichtete Mutagenese.....	37
3.1.14	Rekombinante PCR.....	38
3.1.15	RealTime-PCR (Echtzeit-PCR)	40
3.1.16	DNA-Sequenzierung.....	42
3.2	Zellbiologische Methoden	43
3.2.1	Kultivierung von HUH7- und 293-Zellen.....	43
3.2.2	Transiente Transfektion von HUH7 und 293-Zellen mit Fugene®	44
3.2.3	Zellernte für CAT-Reporterassay	44
3.2.4	Zellernte für Luziferaseassay und elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	45
3.2.5	Herstellung von MARV Antigen	45
3.2.6	Herstellung und Aufreinigung von iVLPs	46
3.2.7	Infektion von HUH7-Zellen mit iVLPs	47
3.2.8	RNA-Isolierung aus iVLPs	47
3.2.9	Bestimmung der minimalen infektiösen Dosis der iVLPs.....	47
3.2.10	Neutralisationsassay.....	48
3.2.11	Gradientenzentrifugation	49
3.2.12	Inkubation von iVLPs mit einem Protein aus humanem Samen bzw. Samen und Samenflüssigkeit	49
3.2.13	Inkubation von iVLPs mit Carboxycyclic 3-deaza-adenosin, Interferon, 3-deaza Neplanocin A und Ribavirin	50
3.3	Biochemische und immunologische Methoden	51
3.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	51
3.3.2	Coomassie®-Färbung	52
3.3.3	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)	52
3.3.4	Antikörperfärbung von Western Blots.....	53
3.3.5	Chemolumineszenztest	54
3.3.6	Entfernung von gebundenen Antikörpern von bereits analysierten PVDF-Membranen	54
3.3.7	Detektion von Western Blots mit Fluorophor-markierten Antikörpern ...	55
3.3.8	Luziferaseassay	55
3.3.9	CAT-Reporterassay.....	56
3.3.10	Autoradiographie	57

3.3.11	Proteinase K-Behandlung	57
3.3.12	Präparation von iVLPs und Zellen für elektronenmikroskopische Studien (Negativkontrastierung)	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Etablierung eines infektiösen Minigenomsystems für Marburg Virus basierend auf Virus-ähnlichen Partikeln (iVLPs)	59
4.1.1	Umstellung des Marburg Virus Minigenomsystems auf eukaryotische Promotoren.....	59
4.1.2	Ausschleusung von iVLPs und Infektion von Zellen in Gegenwart von VP24, VP40 und GP	61
4.1.3	Umstellung des Marburg Virus-spezifischen Minigenomsystems auf das Renilla Luziferase Reportergen	62
4.2	Einfluss verschiedener Mengen der Marburg Virus Expressionsplasmide auf virale Transkription, Partikelbildung und Infektion	64
4.2.1	Titrationanalyse des Nukleoproteins NP	64
4.2.2	Titrationanalyse der Polymerase L.....	66
4.2.3	Titrationanalyse des Polymerasekofaktors VP35.....	68
4.2.4	Titrationanalyse des Nukleokapsidproteins VP30	70
4.2.5	Titrationanalyse des Matrixproteins VP40.....	72
4.2.6	Titrationanalyse des Matrixproteins VP24.....	74
4.2.7	Titrationanalyse des Oberflächenproteins GP	76
4.2.8	Titrationanalyse des Minigenoms 3M-5M luc	79
4.2.9	Vergleich der Proteinverhältnisse im Marburg Virus und iVLP	80
4.3	Unterscheidung sphärischer und filamentöser Partikel.....	82
4.4	Einfluss viraler Proteine auf zelluläre Transkription	85
4.4.1	Inhibitorische Funktion des VP40 auf virale und zelluläre Transkription	85
4.4.2	Einfluss von VP24 und VP35 auf die zelluläre Transkription.....	89
4.5	Einfluss von VP40 auf die virale Replikation.....	90
4.6	Anwendungsmöglichkeiten des iVLP-Systems	93
4.6.1	Analyse eines neutralisierenden Serums	94
4.6.2	Einfluss von Peptiden aus menschlichem Samen auf die Infektion mit iVLPs	96
4.6.3	Einfluss von Carbocyclic-3-deaza Adenosin, 3-deaza-Neplanocin A, Interferon und Ribavirin auf die Infektion mit iVLPs	100
5	Diskussion.....	105
5.1	Etablierung des infektiösen Minigenomsystems für Marburg Virus.....	105
5.2	Morphologische Charakterisierung der Marburg Virus iVLPs	106
5.3	Einfluss verschiedener Mengen der Marburg Virus- Expressionsplasmide auf die verschiedenen Phasen der iVLP-Synthese	108
5.3.1	Rolle der Polymerase L im iVLP-System.....	108
5.3.2	Einfluss von VP40 auf virale Transkription und Replikation.....	109
5.3.3	Einfluss von VP40 auf die zelluläre Transkription.....	111
5.3.4	Einfluss von VP40 auf die iVLP-Menge	112
5.3.5	Einfluss der GP-Menge auf die Infektivität der iVLPs	113
5.3.6	Rolle des VP30 im iVLP-System	114
5.3.7	Rolle des VP24 im iVLP-System	115

5.3.8	Rolle von VP35 und NP im iVLP-System.....	116
5.4	Anwendungsmöglichkeiten des iVLP-Systems.....	118
5.4.1	Einfluss von Peptiden aus humanem Samen auf die Infektion mit iVLPs	118
5.4.2	Das iVLP-System als Testsystem für neutralisierende Seren und antivirale Substanzen	119
6	Zusammenfassung:	122
7	Literaturverzeichnis:	123
8	Abbildungsverzeichnis:.....	140
9	Abkürzungsverzeichnis.....	141
Lebenslauf.....		Error! Bookmark not defined.
Erklärung.....		Error! Bookmark not defined.
Danksagung:		Error! Bookmark not defined.

1 Einleitung

1.1 Taxonomie und Epidemiologie

Marburg Virus (MARV) und Ebola Virus (EBOV) sind die zwei Genera der Familie der *Filoviridae*. Ihren Namen erhalten Vertreter dieser Familie vom lateinischen Wort *filum* (Faden) aufgrund ihrer im Elektronenmikroskop erkennbaren charakteristischen Morphologie (Kiley et al., 1982). Die *Filoviridae* gehören mit den Rhabdo-, Paramyxo- und Bornaviridae zur Ordnung der Mononegavirales, wobei Sequenzanalysen zeigten, dass sie evolutionär den Paramyxoviren am nächsten stehen (Muhlberger et al., 1992; Sanchez et al., 1992). Die hochpathogenen Erreger dieser Gruppe rufen beim Menschen schwere fieberhafte hämorrhagische Erkrankungen hervor, die zu hohen Letalitätsraten und Einstufung in die höchste biologische Sicherheitsstufe L4 führen.

MARV ist nach der gleichnamigen Stadt benannt, wo es zur ersten bekanntgewordenen filoviralen Infektion und Isolierung dieses Erregers kam. Gleichzeitig trat das Virus 1967 auch in Frankfurt am Main und Belgrad auf, wobei es sich bei den Erkrankten hauptsächlich um Laborarbeiter und Tierpfleger handelte, die Kontakt zu Blut und Organen von aus Uganda importierten grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) hatten (Siegert et al., 1967). 32 Krankheitsfälle wurden registriert, wobei 7 von 26 Primärfallpatienten starben. Bei den Sekundärfallpatienten wurde ein wesentlich milderer Krankheitsverlauf beobachtet (Martini et al., 1968; Slenczka, 1999). In den folgenden Jahren kam es nur zu vereinzelten Fällen von MARV-Infektionen in Zimbabwe, Südafrika und Kenia bis es zu einem größeren Ausbruch in Durba in der Demokratischen Republik Kongo zwischen 1998 und 2000 kam (Bertherat et al., 1999; Gear et al., 1975; Johnson et al., 1996; Smith et al., 1982). Betroffen waren dort zum größten Teil Männer, die in einer nahegelegenen Goldmine arbeiteten. Der bisher größte Ausbruch mit einer Mortalität von 88% ereignete sich zwischen

2004 und 2005 in der Provinz Uige in Angola, wobei von 374 Infizierten 329 verstarben. Die Transmission erfolgte vor allem durch die Verwendung von kontaminierten Kanülen bei Injektionen in den lokalen Gesundheitsposten, Kliniken und Eigeninjektionen (Ndayimirije and Kindhauser, 2005; Towner et al., 2006).

EBOV trat erstmals 1976 zeitgleich in Zaire (heute Demokratische Republik Kongo) und Sudan auf. Mehr als 600 Menschen wurden infiziert und die Mortalitätsrate lag bei 53% im Sudan und 88% in Zaire. Das neue Virus, welches dem in Marburg isolierten morphologisch sehr ähnlich war, wurde nach einem Fluss in der Nähe des Epidemiegebietes benannt (Johnson et al., 1977). Später zeigte sich, dass trotz des gleichzeitigen Auftretens der Erkrankungen zwei Subtypen des EBOV unterschieden werden konnten: EBOV Zaire (ZEBOV) und EBOV Sudan (SEBOV). Nachdem es wie auch bei MARV in den folgenden Jahren nur zu kleineren Infektionsherden von EBOV kam, folgte ein großer Ausbruch 1995 in Kiwit (Zaire) bei dem 244 von 315 Infizierten starben und Filoviren zum ersten mal in den Blickwinkel öffentlichen Interesses rückten (1995; Khan et al., 1999; Sanchez et al., 1995). In den letzten Jahren kam es zu Ausbrüchen in Uganda, Gabon, der Republik Kongo, der Demokratischen Republik Kongo und im Sudan, wobei der größte Ausbruch von EBOV mit 425 Erkrankten in Gulu in Uganda stattfand. Die ersten Fälle blieben bei diesem Ausbruch unerkannt und ermöglichten dem Virus eine große Ausbreitung über Krankenhäuser, in denen die Betroffenen behandelt wurden (Arthur, 2002; Peters, 2005; Pourrut et al., 2005).

Reston-EBOV (REBOV) wurde 1989 entdeckt, als es zu hämorrhagischen Fiebererkrankungen unter *Cynomolgus* Makaken (*Macaca fascicularis*) kam, welche von den Philippinen in die USA importiert wurden und sich dort in Quarantäne befanden. Beim Menschen verliefen alle nachgewiesenen Infektionen klinisch unauffällig; für Affen ist es hingegen hochpathogen (Jahrling et al., 1990).

Die vierte EBOV-Spezies Ivory Coast (CIEBOV) konnte nur einmal aus Menschen isoliert werden. Betroffen war eine Wissenschaftlerin, die eine Autopsie an einem Schimpansen vorgenommen hatte, welcher an einer Hämorrhagie im Tai-Nationalpark an der Elfenbeinküste verstorben war (Formenty et al., 1999; Le Guenno et al., 1999).

	Jahr	Ort	Erkrankungen	Todesfälle (human)	Mortalität %
Marburg Virus	1967	Deutschland; Jugoslawien	23	5	23
	1975	Südafrika	3	1	33
	1980	Kenia	2	1	50
	1987	Kenia	1	1	100
	1990	Russland	1	1	100
	1998-2000	Demokr. Republik Kongo	154	128	83
	2004-2005	Angola	374	329	88
	2007	Uganda	3	1	33
	2008	Uganda	1	1	100
Ebola Virus Zaire	1976	Zaire	318	280	88
	1977	Zaire	1	1	100
	1994-1995	Gabon	49	29	59
	1995	Demokr. Republik Kongo	315	255	81
	1996	Gabon	31	21	68
	1996-1997	Gabon	60	45	75
	2001-2002	Gabon; Demokr. Republik Kongo	124	97	78
	2002-2003	Republik Kongo	143	128	90
	2003	Republik Kongo	35	29	83
	2005	Republik Kongo	12	9	75
	2007	Demokr. Republik Kongo	264	187	71
	2007-2008	Uganda (Einordnung Subtyp unklar)	149	37	25
Ebola Virus Sudan	1976	Sudan	284	151	53
	1979	Sudan	34	22	63
	2000-2001	Uganda	425	224	53
	2004	Sudan	17	7	41
Ebola Virus Reston	1989	USA	4	0	0
	1990	USA	0	0	0
	1992	Italien	0	0	0
	1996	USA	0	0	0
Ebola Virus Ivory Coast	1994	Côte d'Ivoire	1	0	0

Abb. 1.1: Gemeldete Fälle und Ausbrüche von humanen Marburg und Ebola Virus Infektionen. Auflistung aller dokumentierten Fälle von 1966 bis 2008 (ohne Aufführung der unspezifischen Ebola Virus Laborinfektionen [1996 Russland 1(1†); 2004 Russland 1(1†); 2004 USA 1 (0†)]) (In Anlehnung an (Ascenzi et al., 2008), WHO, CDC).

Das natürliche Reservoir von Filoviren konnte trotz ausgedehnter Untersuchungen bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Bei den Ausbrüchen in Gabon 1996 und Kongo 2001 und 2005 konnte ein direkter Kontakt der Indexpatienten mit Gorillas und Schimpansen bzw. deren Kadavern nachgewiesen werden, jedoch lassen sie sich aufgrund der für sie hohen Pathogenität als natürlicher Wirt ausschließen. Experimentell infizierte Affen verstarben ausnahmslos an der Infektion (Fisher-Hoch and McCormick, 1999; Ryabchikova et al., 1999; Simpson, 1977). Als potentielle Wirte kommen vielmehr Flughunde in Betracht. Einige Flughundspezies entwickeln nach einer Infektion mit Filoviren keine Symptome und scheiden die Viren mit dem Kot aus (Swanepoel et al., 1996). Auch konnten MARV und EBOV in verschiedenen Flughundspezies nachgewiesen werden (Leroy et al., 2005; Swanepoel et al., 2007; Towner et al., 2007). Flughunde werden von manchen Bevölkerungsgruppen in Afrika als Nahrung verzehrt, womit ein enger Kontakt zum Menschen hergestellt ist, der zu einer Infektion mit Filoviren erforderlich ist. Von einigen Gruppen konnte eine Persistenz des MARV in Moskitos der Spezies *Aedes aegypti* über mehrere Wochen nachgewiesen werden, was andeutet, dass diese als natürliche Wirt in Betracht kommen könnten. Allerdings lässt das doch seltene Auftreten filoviraler Infektionen darauf schließen, dass Filoviren keine Arboviren sind (Kunz et al., 1968; Monath, 1999).

Serologische Studien belegen das endemische Vorkommen von Filoviren in dem zentralafrikanischen Raum. Im sogenannten Ebola-Gürtel, der die Länder Sudan, Kenia, Zaire und Uganda bis zur Elfenbeinküste umfasst, konnten Filovirus-spezifische Antikörper auch bei Personen nachgewiesen werden, die nachweislich zu keiner Zeit klinische Symptome einer EBOV-Infektion zeigten (Hughes et al., 1986; Slenszka, 1984). Ebenso gilt das Vorkommen von Infektionen mit asymptomatischem Verlauf als sicher (Baize et al., 2001; Leroy et al., 2000). In Deutschland konnten Antikörper bei Menschen, die in keinem Zusammenhang zu Infektionen standen, nachgewiesen werden. Ob dies auf serologische Kreuzaktivitäten mit anderen Mononegavirales oder aber auf eine

Infektion mit Filoviren geringerer Pathogenität zurückzuführen ist, ist bisher unklar (Becker et al., 1992).

Die Übertragung der Filoviren erfolgt über Haut- und Schleimhautläsionen und den Kontakt mit Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel und Sperma (Simpson, 1977). Für das MARV konnte experimentell eine Übertragung durch Aerosole gezeigt werden, jedoch konnte diese beim Menschen nicht nachgewiesen werden, so dass diese Übertragung unter natürlichen Bedingungen als unwahrscheinlich gilt (Jaax et al., 1995; Johnson et al., 1995; Pokhodiaev et al., 1991).

1.2 Klinik und Pathologie des Marburg Virus

Obwohl genetisch unterschiedlich, führen Infektionen mit MARV und EBOV zu sehr ähnlichen Krankheitsbildern bei Menschen und nichtmenschlichen Primaten. Nach einer Inkubationsphase von fünf bis sieben Tagen kommt es zum plötzlichen Auftreten unspezifischer Symptome einhergehend mit einem schweren Krankheitsgefühl. So kommt es neben Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, abdominalen Schmerzen und Durchfällen oft auch zu neurologischen Begleiterscheinungen wie Verwirrheitszuständen und Bewusstlosigkeit (Martini et al., 1968). Am Ende der ersten Woche folgt oft die Ausprägung eines makulopapulösen Exanthems, welches im weiteren Verlauf eine Hautschuppung zur Folge hat. Bei 70-80% der Erkrankten kommt es zu einer hämorrhagischen Manifestation, welche mit schweren intestinalen Blutungen, Nasen- und Zahnfleischblutungen, sowie konjunktivalen Petechien einhergeht (Peters and Khan, 1999). Beim fulminanten Verlauf tritt der Tod ein bis zwei Wochen nach Krankheitsbeginn auf. Die fatal verlaufenden Fälle sind von hämorrhagischer Diathese, einer Verbrauchskoagulopathie gefolgt von hypovolämischem Schock und Multiorganversagen gekennzeichnet.

Während das ZEBOV lange Zeit als virulentestes Filovirus angesehen wurde und MARV nach dem Ausbruch von 1967 mit einer Mortalitätsrate von 25% als das

am wenigsten pathogene Filovirus, widerlegten die MARV-Ausbrüche in der Demokratischen Republik Kongo und Angola mit einer Mortalitätsrate von über 80% dieses Bild. Es kann davon ausgegangen werden, dass in Entwicklungsländern die Letalitätsrate aufgrund der nicht gewährleisteten intensivmedizinischen Betreuung wesentlich höher ist als 1967 in Marburg.

Die Zellen des monozytär-phagozytischen Systems (MPS) sind die primären Zielzellen von Filovirusinfektionen. Von hier aus breiten sich Filoviren dann mittels Monozyten und Makrophagen über die Lymph- und Blutgefäßbahnen im Organismus des Infizierten aus (Feldmann et al., 1996; Ryabchikova et al., 1996; Stroher et al., 2001). Histopathologisch manifestiert sich die Infektion in ausgeprägten Organnekrosen, die zunächst Lymphknoten, Milz und Leber und später Nieren und Lunge betreffen (Feldmann et al., 1996; Peters, 1996; Zaki, 1997). Das Auftreten der Hämorrhagien und des Schocksyndroms lässt sich wahrscheinlich auf eine vaskuläre Instabilität des Endothels zurückführen. Die Infektion von Monozyten und Makrophagen induziert die Ausschüttung von Zytokinen, beispielsweise des Tumornekrosefaktors α (TNF- α). Dadurch wird vermutlich die Durchlässigkeit des Endothels erhöht, ohne dass dieses selbst infiziert sein muss (Feldmann et al., 1996; Schnittler and Feldmann, 1999; Stroher et al., 2001; Villinger et al., 1999). Eine generelle Störung der Blutgerinnung wird vermutet, da sich Fibrin und Fibrinsspaltprodukte in den Nierentubuli finden (Martini, 1973).

Die Infektion mit Filoviren verläuft in vielen Fällen mit einer verzögerten bzw. nicht vorhandenen humoralen Immunantwort. Diese Störung der Immunantwort lässt sich auf die massive Infektion der Zellen des MPS und eine Lymphozytendepletion zurückführen, die wahrscheinlich durch eine sogenannte bystander Apoptose ausgelöst wird (Ksiazek et al., 1999).

Bis heute ist keine spezifische Therapie oder Vakzine gegen MARV oder EBOV verfügbar, so dass nur eine intensivmedizinische symptombezogene Therapie des hämorrhagischen Schocks erfolgt. Die Gabe von Rekonvaleszentenserum, equiner anti-EBOV Immunglobuline und Interferon wurden in der Therapie humaner Filovirusinfektionen eingesetzt, ihre Effizienz ist aber bisher nicht

einwandfrei belegt (Bray and Paragas, 2002; Bray and Pilch, 2006). Auch die Dialyse des Blutes der Erkrankten war nicht erfolgreich. Der Einsatz eines rekombinant hergestellten Inhibitors des Gewebefaktors VIIa (rNAPc2) in EBOV-infizierten Makaken hingegen ließ deren Überlebensrate von 0% auf 33% steigen (Geisbert and Hensley, 2004; Geisbert et al., 2003).

Seit jeher wurde auch der Versuch unternommen, eine geeignete Vakzine zu finden. Klassische Impfstrategien mit abgetöteten Viren zeigten zwar teilweise Erfolge im Meerschweinchen aber nicht im Affen-Modell (Geisbert et al., 2002; Hevey et al., 2001; Reed and Mohamadzaheh, 2007). Der Einsatz von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) konnte bereits im Nager- und Affenmodell erfolgreich getestet werden (Swenson et al., 2008b; Swenson et al., 2005; Warfield et al., 2003; Warfield et al., 2005; Warfield et al., 2004). Auch der Einsatz rekombinant hergestellter replikationskompetenter Vakzinen, welche GP alleine oder in Kombination mit NP und VP40 exprimierten, scheint erfolgreich zu sein (Bukreyev et al., 2006; Hevey et al., 2001; Jones et al., 2005; Mellquist-Riemenschneider et al., 2003; Rao et al., 2002; Riemenschneider et al., 2003; Sullivan et al., 2000; Swenson et al., 2008a; Swenson et al., 2004; Swenson et al., 2005; Wang et al., 2006a; Wang et al., 2006b; Warfield et al., 2004). Auch die Verwendung interner Strukturproteine wie VP24, VP30 und VP35 in einem rekombinanten Venezuelan-equine-Encephalitis (VEE) Vektor zeigte im Mausmodell einen Schutz gegen MARV- und EBOV-Infektionen (Hevey et al., 1998; Wilson et al., 2001). Als aussichtsreich gilt ebenfalls die Verwendung eines rekombinanten Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) welches die Oberflächenproteine von MARV oder EBOV exprimiert. In Affen (*Macaca fascicularis*) führte eine einzige Immunisierung zu einer Immunantwort, die einen vollständigen Schutz vor einer Virusinfektion zur Folge hatte (Jones et al., 2005). Selbst eine therapeutische Immunisierung bis zu einer halben Stunde nach der MARV-Infektion war für diesen Impfstoffkandidaten erfolgreich (Jones et al., 2005).

1.3 Morphologie und Genomstruktur

Charakteristisch für MARV ist seine im Elektronenmikroskop erkennbare filamentöse Gestalt (Abb. 1.2 B). Die Virionen sind umhüllt und von pleomorpher Gestalt; es kommen langgestreckte, gebogene und zirkuläre Strukturen vor. Während der Durchmesser von 80 nm bei allen untersuchten MARV-Partikeln konstant ist, ist die Länge der Partikel variabel. Es kommen Partikel vor, die bis zu 1400 nm lang sind (Feldmann and Kiley, 1999; Feldmann et al., 1993). Aufgebaut sind die Virionen aus sieben Strukturproteinen, wobei das einzige viruskodierte Oberflächenprotein GP in der Hüllmembran als Homotrimer vorliegt (Feldmann et al., 1991). Im Inneren des Partikels befindet sich die virale RNA, die in einem Nukleokapsidkomplex zusammen mit den Proteinen NP, L, VP35 und VP30 vorliegt. Die Verbindung dieses Komplexes zur Membran wird über die Matrixproteine VP40 und VP24 vermittelt (Becker et al., 1998; Kiley et al., 1988; Kolesnikova et al., 2002; Bamberg et al., 2005) (Abb. 1.1 A).

Das Genom ist nicht segmentiert und besteht aus einem 19 kb langen linearen RNA-Strang in negativer Orientierung. Es kann nicht von der Wirtszelle transkribiert oder vermehrt werden; alle dafür notwendigen Enzyme sind Bestandteil des Virions (Kiley et al., 1988). An den 3'- und 5'-Enden des Genoms befinden sich nicht kodierende Leader- und Trailer-Sequenzen in denen sich die Signale für Replikation, Transkriptionsinitiation und Verpackung befinden (Muhlberger et al., 1998). Zwischen den Genen befinden sich kurze nicht transkribierte, intergenische Regionen, welche zwischen VP30 und VP24 überlappen und die Signale für Transkriptionsstart und -stopp beinhalten (Feldmann et al., 1992; Muhlberger et al., 1996; Sanchez et al., 1993; Weik et al., 2005).

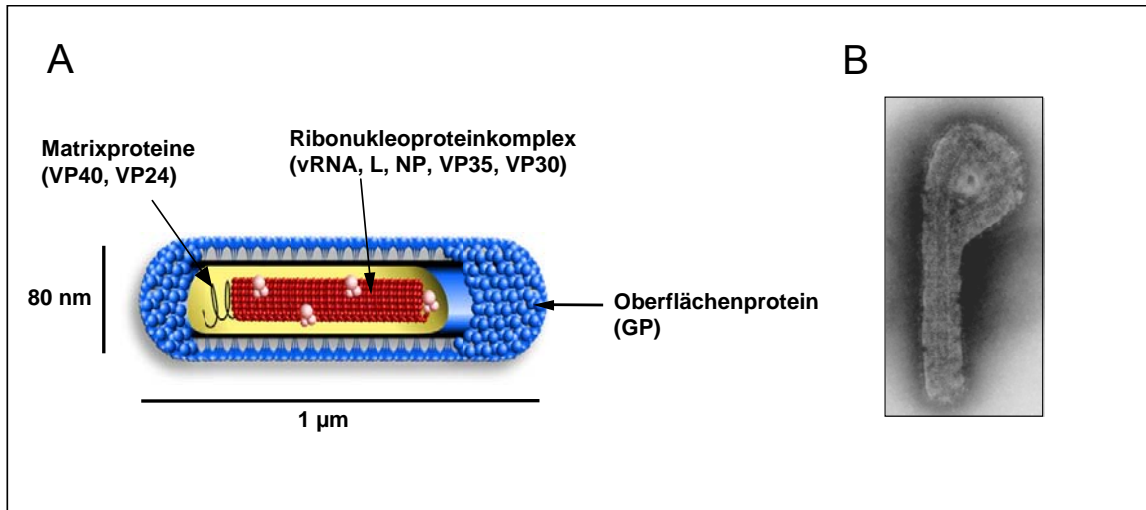


Abb. 1.2: Struktur des Marburg Virus.

(A) Schematische Darstellung und (B) elektronenmikroskopische Aufnahme mit 50000facher Vergrößerung, Negativkontrastierung mit Phosphowolframsäure. Zur Verfügung gestellt von Dr. Larissa Kolesnikova.

1.4 Proteine des Marburg Virus

1.4.1 NP

NP ist Bestandteil des Nukleokapsidkomplexes und das im Virion am stärksten vertretene Protein. Es enkapsidiert die virale RNA und ist sowohl an Transkriptions- und Replikationsprozessen als auch am viralen Assembly und Budding beteiligt (Becker et al., 1998; Kolesnikova et al., 2000; Mavrakakis et al., 2002). Das 695 AS große Protein kommt in einer phosphorylierten und einer nicht phosphorylierten Form vor, wobei im Virion nur die phosphorylierte Form zu finden ist. (Becker et al., 1994; Lotfering et al., 1999). Der hydrophobe N-Terminus des NP zeigt Sequenzhomologien zu anderen Viren der Ordnung Mononegavirales, der hydrophile C-Terminus ist variabel und enthält wahrscheinlich MARV-spezifische Funktionen (Bourhis et al., 2004; Sanchez et al., 1992).

1.4.2 VP35

Das 329 AS lange VP35 dient der Polymerase des Virus als viraler Kofaktor, und spielt damit eine essentielle Rolle bei der viralen Transkription und Replikation. Hierzu scheint die Homooligomerisierung des Proteins über ein coiled-coil Motiv

notwendig zu sein (Moller et al., 2005). VP35 ist nur schwach phosphoryliert, stellt aber trotzdem in seiner Funktion ein Analog zu dem Phosphoprotein anderer Mononegavirales dar (Muhlberger et al., 1998; Muhlberger et al., 1999). Zusammen mit VP40 scheint es auszureichen um die virale RNA in VLPs zu verpacken (Johnson et al., 2006a; Johnson et al., 2006b). VP35 fungiert außerdem als Typ I Interferonantagonist und kann so die zellulären Abwehrmechanismen umgehen (Basler et al., 2000; Cardenas et al., 2006). Es inhibiert die Aktivierung des Interferon Regulatorischen Faktors 3 (IRF-3), einem Transkriptionsfaktor für die Induktion der frühen antiviralen Antwort (Basler et al., 2003; Hartman et al., 2008). Es scheint die PKR-Aktivierung zu blockieren, eine Schlüsselkomponente der Interferon-induzierten antiviralen Immunantwort und so auch für die hohe Pathogenität verantwortlich zu sein (Feng et al., 2007; Gale et al., 1998; Johnson et al., 2006a).

1.4.3 VP40

Das 38 kDa schwere VP40 ist das am stärksten vertretene Matrixprotein des MARV. Es befindet sich zwischen der viralen Hülle und dem Nukleokapsid und sorgt für die strukturelle Integrität der Partikel (Becker et al., 1998; Geisbert and Jahrling, 1995). VP40 spielt eine entscheidende Rolle beim Virus-Assembly und -Budding und bindet sehr effizient an Membranen (Hartlieb and Weissenhorn, 2006; Jasenosky and Kawaoka, 2004; Kolesnikova et al., 2002; Licata et al., 2004; Ruigrok et al., 2000; Schmitt and Lamb, 2004). So ist es nach solitärer Expression in der Lage, seine eigene Freisetzung in Virus-ähnlichen Partikeln zu bewerkstelligen (Kolesnikova et al., 2004a; Swenson et al., 2004; Timmins et al., 2001). MARV VP40 ist in der Lage, mit internen Membranen des späten endosomalen Kompartiments (multivesicular bodies (MVB)) zu interagieren (Kolesnikova et al., 2004a; Kolesnikova et al., 2002). Möglicherweise spielen hierfür bestimmte Sequenzen im N-Terminus des Proteins eine Rolle. So interagieren vielleicht zelluläre Proteine mit diesen so genannten Late-Domänen und spielen so bei der Sortierung und Abschnürung von Vesikeln in die MVB eine Rolle (Harty et al., 1999; Licata et al., 2003; Martin-Serrano et al., 2004; Timmins et al., 2003). Es konnte ein PPPY-Motiv identifiziert werden, dass für die VP40-

induzierte Abschnürung von VLPs verantwortlich ist (Kolesnikova, 2009; Urata et al., 2007). Für das EBOV VP40 konnte gezeigt werden, dass es über Regionen im N-Terminus dimerisiert und es wurden Oktamere nachgewiesen, die aus vier Dimeren bestehen (Gomis-Ruth et al., 2003). Diese Konformation und die RNA-bindenden Eigenschaften des VP40 scheinen essentiell für den Lebenszyklus des Virus zu sein (Hoenen et al., 2005).

1.4.4 GP

Das 220 kDa große Glykoprotein stellt das einzige virale Oberflächenprotein des MARV dar und liegt als Homotrimer vor (Feldmann et al., 1991). Es repräsentiert ein klassisches Typ 1 Membranprotein und fusioniert die Virushülle mit der Wirtsmembran nach Infektion (Schibli and Weissenhorn, 2004). GP gliedert sich in eine N-terminale luminale Domäne von 643 AS, eine Transmembrandomäne mit 29 AS und eine zytoplasmatische C-terminale Domäne von 11 AS, wobei die Transmembrandomäne für die Rekrutierung des GP in MVB und Virus-ähnliche Partikel (VLPs) verantwortlich ist (Mittler et al., 2007). Das MARV GP wird von einem durchgängigen Leserahmen kodiert, während die Synthese des membranverankerten EBOV GP erst nach einem RNA-editing-Schritt erfolgen kann (Sanchez et al., 1996; Volchkov et al., 1995). Das primäre Produkt des EBOV GP-Gens stellt das lösliche sGP dar, welches von infizierten Zellen sekretiert wird und im Serum infizierter Personen nachgewiesen werden kann (Falzarano et al., 2006; Sanchez et al., 1999; Takada and Kawaoka, 2001; Volchkova et al., 1998). GP wird stark N- und O-glykosyliert, in der Nähe des Transmembranankers acyliert und an seiner Ektodomäne an Serinresten phosphoryliert. Während des Transports zur Plasmamembran wird GP durch Furin in zwei über Disulfidbrücken verbundene Untereinheiten GP1 (170kDa) und GP2 (40kDa) gespalten (Feldmann et al., 1991; Funke et al., 1995; Geyer et al., 1992; Sanger et al., 2002; Volchkov et al., 2000b). Während des Eindringens in die Zielzellen wird GP durch endosomale Cathepsine gespalten, was zur Aktivierung der Fusionseigenschaften essentiell ist (Alazard-Dany et al., 2006).

1.4.5 VP30

VP30 ist 33 kDa groß, gehört neben L, NP und VP35 zu den Nukleokapsidkomponenten und bindet an NP (Becker et al., 1998; Modrof et al., 2001; Muhlberger et al., 1998). Die Funktion bei MARV ist bisher nicht eindeutig geklärt, da es im artifiziellen Minigenomsystem für Replikation und Transkription nicht notwendig ist, sein Abschalten mittels RNA-Interferenz jedoch eine Reduktion aller anderen Proteine zur Folge hat (Fowler et al., 2005; Muhlberger et al., 1998). Wird ein auf cDNA basierendes MARV-Genom mit den Nukleokapsidproteinen in Zellen exprimiert, ist für die Bildung neuer rekombinanter Viren die Anwesenheit des VP30 zwingend erforderlich (Enterlein et al., 2006).

Beim EBOV fungiert das VP30 als Transkriptionsaktivator (Modrof et al., 2003; Muhlberger et al., 1999; Weik et al., 2002). In dieser Funktion interagiert das VP30 in trans mit RNA-Sekundärstrukturen auf dem viralen Genom in der Nähe der ersten Transkriptionsstartstelle und ist zudem für die Reinitiierung der Transkription verantwortlich (John et al., 2007; Martinez et al., 2008; Weik et al., 2002) (siehe auch 1.5). VP30 ist stark phosphoryliert und diese Modifikation scheint ein wichtiges regulatorisches Element in Bezug auf die transkriptionsaktivierende Funktion des Proteins zu sein (Modrof et al., 2003; Modrof et al., 2002).

1.4.6 VP24

VP24, welches bei keinem anderen Vertreter der Mononegavirales ein Funktionsäquivalent hat, stellt ein zweites Matrixprotein dar und ist, wie VP40, zwischen Nukleokapsid und Membran lokalisiert (Becker et al., 1998; Elliott et al., 1985). Die Funktion des VP24 ist bislang noch nicht verstanden. Bei EBOV scheint es eine wichtige Rolle während der Nukleokapsidmorphogenese zu spielen (Huang et al., 2002; Watanabe et al., 2004). Außerdem konnte in einem EBOV infektiösen VLP-System (iVLP-System) gezeigt werden, dass in Abwesenheit von VP24 die gebildeten Nukleokapside von dem Nukleokapsid-assoziierten Transkriptionskomplex nicht abgelesen werden können (Hoenen et al., 2006). In MARV infizierten Zellen führt das Abschalten von VP24 mittels

RNA-Interferenz zu einer Verringerung der Anzahl ausgeschleuster Virionen (Bamberg et al., 2005; Fowler et al., 2005). Für EBOV konnte gezeigt werden, dass VP24 in die Interferon-Signalkaskade eingreift und so die zellbasierte Abwehr von Virusinfektionen hemmt (Reid et al., 2006; Reid et al., 2007; Volchkov et al., 2000a).

1.4.7 L

Das L Protein ist mit einem Molekulargewicht von 220 kDa das größte MARV-Protein, welches mengenmäßig im Virion am wenigsten vorkommt. Ihm werden die enzymatischen Funktionen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase zugeschrieben (Muhlberger et al., 1998; Muhlberger et al., 1992). In L finden sich drei hochkonservierte Bereiche, die ebenfalls bei L Proteinen anderer Viren der Ordnung Mononegavirales nachweisbar sind und vermutlich mit den enzymatischen Funktionen der Polymerase korrelieren (Muhlberger et al., 1992; Poch et al., 1990; Volchkov et al., 1999).

1.5 Transkription und Replikation des MARV

Die Adsorption und Aufnahme von MARV in die Wirtszellen wird durch das Oberflächenprotein GP vermittelt. Da eine Vielzahl von menschlichen Zellen infiziert werden können, werden dabei höchstwahrscheinlich verschiedene Rezeptormoleküle verwendet (Becker et al., 1995; Ito et al., 2001; Schnittler et al., 1993; Stroher et al., 2001; Wool-Lewis and Bates, 1998; Yang et al., 2000). Auf Hepatozyten wurde der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGP-R) für den Eintritt des Virus identifiziert (Becker et al., 1995). Obwohl er bei der Infektion von primären Zellen keine Rolle spielt, wurde der ubiquitär vorkommende Folatrezeptor alpha als Kofaktor für den Eintritt des EBOV beschrieben (Chan et al., 2001; Simmons et al., 2003b; Sinn et al., 2003). Als weitere Kofaktoren zur Konzentrierung des EBOV auf den Zielzellen kommen die auch auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimierten C-Typ Lektine DC-SIGN, DC-SIGNR, hMGL und LSECTin in Frage (Gramberg et al., 2005; Lin et al., 2003;

Marzi et al., 2004; Simmons et al., 2003a; Takada et al., 2004). Ebenso scheinen auch Rezeptoren der Tyro3-Familie als zelluläre Eintrittsfaktoren für die Aufnahme von EBOV und MARV eine Rolle zu spielen (Shimajima et al., 2006). MARV gelangt durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle. In endosomalen Kompartimenten kommt es zur Fusion der viralen mit der endosomalen Membran, was zur Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytoplasma führt (Empig and Goldsmith, 2002; Mar'iankova et al., 1993). Für die anschließende Transkription und Replikation sind beim MARV die Proteine L, NP und VP35 notwendig, während das EBOV zusätzlich noch das VP30 zur Transkription benötigt (Muhlberger et al., 1998; Muhlberger et al., 1999). Es werden im Zuge der Transkription zunächst monocystronische, polyadenylierte mRNAs gebildet, welche vom zellulären Proteinsyntheseapparat translatiert werden (Feldmann et al., 1992; Muhlberger et al., 1996; Sanchez et al., 1993). Die sieben Gene des Virus werden dabei nacheinander abgelesen (Galinski, 1991). Nichttranslatierte Bereiche der Transkripte enthalten vermutlich regulatorische Funktionen bei der Proteinbiosynthese (Muhlberger et al., 1996; Weik et al., 2002). Nach der Transkription, die die Voraussetzung für die virale Proteinsynthese darstellt, wird das Genom durch die Polymerase in ein positives Antigenom umgeschrieben, welches dann als Matrize für die Synthese neuer negativsträngiger Genome dient. Beide Genomtypen liegen dabei immer in enkapsidierter Form vor (Muhlberger et al., 1999). Die Verpackung der RNA zu Nukleokapsidkomplexen kann durch die etwa 10 Stunden nach der Infektion erscheinenden typischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen verfolgt werden, in denen die neugebildeten Nukleokapside akkumulieren (Kolesnikova et al., 2000). Für den Transport einzelner Nukleokapside aus den Einschlusskörperchen zur Plasmamembran ist das Matrixprotein VP40 verantwortlich (Dolnik et al., 2008). Für das verwandte EBOV ist gezeigt, dass VP40 mit Mikrotubuli interagieren kann, was eine Rolle beim Transport von viralen Komponenten nahelegt (Becker et al., 1998; Geisbert and Jahrling, 1995; Licata et al., 2004; Ruthel et al., 2005). Auch der Kontakt der Nukleokapside zu dem in die Plasmamembran eingelagerten GP wird über VP40 vermittelt.

Schließlich ist VP40 der bestimmende Faktor, der die Ausstülpung der Wirtszellmembran initiiert und die Freisetzung von Nachkommenviren an der Plasmamembran ermöglicht (Hartlieb and Weissenhorn, 2006). Die Freisetzung reifer Virionen erfolgt etwa 22 Stunden nach der Infektion.

1.6 Reverse genetische Systeme für Filoviren

Reverse Systeme, mit denen auf Grundlage von cDNA Viren oder Virus-ähnliche Partikel hergestellt werden, ermöglichen in der molekularen Virologie die Untersuchung verschiedenster Aspekte der Virusvermehrung.

Für Filoviren konnten Systeme etabliert werden, welche durch Transfektion einer cDNA zur Bildung neuer Viren führten (Enterlein et al., 2006; Neumann et al., 2002; Volchkov et al., 2001). Die Tatsache, dass man auch bei diesen Arbeiten auf ein Sicherheitslabor der Stufe 4 angewiesen ist, welches auf wenige Standorte beschränkt ist, stand weiteren Untersuchungen im Wege. Die Etablierung eines Minigenomsystems für MARV ermöglichte es schließlich die Rolle der Nukleokapsidproteine während der viralen Replikation und Transkription unter normalen Laborbedingungen (BSL-1) zu untersuchen. Das Minigenom besteht aus einem Reportergen in Negativorientierung und den 3'-Leader und 5'-Trailer-Sequenzen des viralen Genoms. Diese Sequenzen enthalten alle für die Replikation, Transkription und Verpackung notwendigen Informationen. Im 5'-Bereich des Minigenoms befindet sich ein T7-Promotor und im 3'-Bereich eine Sequenz, welche für das Hepatitis Delta Ribozym kodiert. Beide Elemente sind notwendig, damit die von cDNA durch die T7-Polymerase synthetisierte Minigenom-RNA exakte 3'- und 5'-Enden besitzen. Dies ist für die Erkennung durch die virale Polymerase essentiell.

So konnte gezeigt werden, dass drei der vier Nukleokapsidproteine (L, NP, VP35) sowohl notwendig als auch ausreichend für die Transkription und Replikation des MARV sind (Muhlberger et al., 1998).

Watanabe et al konnten schließlich ein System entwickeln, mit dem es möglich ist, infektiöse virusähnliche Partikel (iVLP) des EBOV herzustellen (Watanabe et

al., 2004). Dazu werden Expressionsplasmide, die alle viralen Proteine und die T7-Polymerase kodieren, zusammen mit einem Minigenom in Zellen transfiziert (Abb. 1.3).

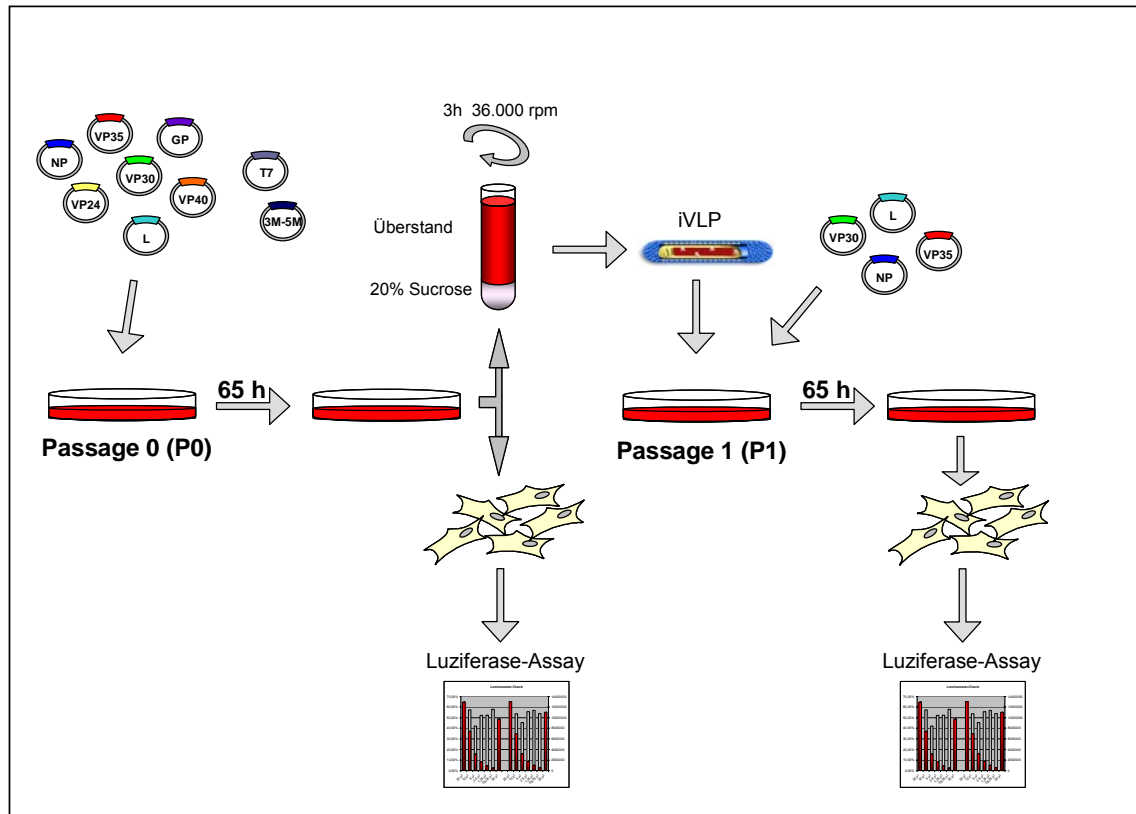


Abb. 1.3: Schematische Übersicht über das iVLP-System.

293-Zellen wurden mit pCAGGS-L, -VP35, -VP30, -NP, -VP24, -VP40, -GP, -T7 und dem Minigenom 3M-5M luc, welches ein Luciferase-Reportergen enthält, transfiziert. Die Zellen (P0-Passage) wurden für 65 h inkubiert, im Anschluss lysiert und die Lysate für einen Reportergenassay verwendet. Der Zellkulturüberstand, der die gebildeten iVLPs enthält, wurde ultrazentrifugiert. Die gereinigten iVLPs wurden zur Infektion von HUH7-Zellen (P1-Passage) verwendet. Diese Zellen waren 16 h vor der Infektion mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden, um eine Verstärkung der Reportergenaktivität zu erreichen. Nach einer 65-stündigen Inkubation folgte die Zellyse und Bestimmung der Reportergenaktivität.

Nach der Transfektion der Expressionsplasmide werden die unter der Kontrolle des Polymerase II Promotors stehenden viralen Gene und die T7-Polymerase exprimiert und liegen in der Zelle in ausreichender Menge vor. Die T7-Polymerase, eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, synthetisiert nun einen Minigenom-RNA-Strang, dessen 3'-Ende durch die autokatalytische Spaltung des Ribozyms festgelegt wird. Die Nukleokapsidproteine L, NP, VP35 und VP30 nutzen diesen RNA-Strang für die folgende Transkription und Replikation. Im

Zuge der Transkription wird mRNA des Reportergens synthetisiert, welche von der Zelle in Proteine translatiert wird und deren Aktivität gemessen werden kann. Während der Replikation entstehen zunächst positivsträngige Antigenome, welche durch die viralen Nukleokapsidproteine verpackt werden und wiederum als Matrize für die Bildung negativsträngiger Minigenome dienen. VP24 und VP40 initiieren den Transport der gebildeten Mininukleokapside und deren Ausschleusung an der Plasmamembran. Bei der Bildung der Virushülle wird GP eingebaut, was bedeutet, dass die ausgeschleusten Partikel (iVLPs) neue Zellen infizieren können.

Zielzellen können mit dem Zellüberstand inkubiert werden (Passage 1). Findet eine Infektion der Zielzellen durch die iVLPs statt, lässt sich dies anhand der Reportergenaktivität des transkribierten Minigenoms nachweisen. Werden die Zielzellen zuvor mit Expressionsplasmiden für die Nukleokapsidproteine transfiziert, so findet eine Erhöhung der Reportergenaktivität dieser Zellen statt, da die Nukleokapsidproteine Polymerasekomplexe ausbilden und das eingedrungene Minigenom ablesen können, was die Transkriptionsaktivität erhöht (Watanabe et al., 2004) (Abb. 1.3).

1.7 Fragestellung:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein System für Marburg Virus (MARV) zu etablieren, das die Herstellung von iVLPs ermöglichen sollte. Dieses System sollte genau charakterisiert werden um anschließend für funktionelle Untersuchungen der viralen Proteine auch außerhalb eines BSL-4 Labors zur Verfügung zu stehen.

Zu Beginn dieser Arbeit lag ein MARV-spezifisches Minigenomsystem vor, mit welchem die Rolle der Nukleokapsidproteine während der viralen Replikation und Transkription untersucht werden konnten (Muhlberger et al., 1998). In diesem System wird das Minigenom von den viralen Nukleokapsidproteinen transkribiert, repliziert und gleichzeitig zu Mininukleokapsiden verpackt. Es sollte nun versucht werden, durch die Expression der viralen Proteine VP24, VP40 und GP die Umhüllung der Mininukleokapside an der Plasmamembran zu initiieren. Diese Partikel sollten dann aus der Zelle ausgeschleust werden und als iVLPs im Zellüberstand vorliegen. Um die Infektiosität der iVLPs zu testen, sollten neue Zielzellen mit dem Zellüberstand inkubiert werden, deren Infektion sich anhand der Reportergenaktivität des transkribierten Minigenoms nachweisen lassen sollte. Die Aktivität des Reportergens in den neuen Zielzellen sollte somit ein Hinweis auf die erfolgreiche Verpackung und Ausschleusung des Minigenoms und die Infektiosität der iVLPs sein. Um zu untersuchen, wie das virale System auf Veränderungen der intrazellulären Konzentrationen viraler Proteine reagiert und damit möglicherweise Transkription/Replikation, Ausschleusung und Infektiosität gesteuert werden können, sollten die einzelnen Expressionsplasmide titriert und die Auswirkungen auf die einzelnen Phasen der Virusvermehrung analysiert werden. Durch Verwendung des Reportergens Luziferase sollte eine schnelle, sensitive und standardisierbare Quantifizierung der Transkriptions- und Replikationsaktivität des viralen Nukleokapsidkomplexes in den Zielzellen ermöglicht werden.

2 Material

2.1 Geräte

Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Bio-Imager Analyzer BAS-1000	Fuji
Branson Sonifier 450	Heinemann
Brutschrank C200	Labotec
Elektroporator Gene pulser Xcell	Biorad
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Geiger-Müller-Zähler	Berthold
GelDoc 2000	Biorad
Genequant II DNA / RNA Calculator	Amersham Pharmacia Biotech
Horizontalschüttler HS 250 Basis	IKA Labortechnik
J2 21 Zentrifuge	Beckmann
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Laser-scanning Mikroskop 510 Meta	Zeiss
LiCor Odyssey Infrared Imaging System	Biosciences
Liquid Scintillation System LS1801	Beckmann
Luminometer Centro LB 960	Berthold
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO	IKA Labortechnik
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
Metallblockthermostat TCS	Lab Tech Barkey
Minifuge RF	Heraeus Sepatech
pH-Meter CG 832	Schott Laborgeräte
Pipettus® Akku	Hirschmann Laborgeräte
Power Supply EV231	Consort
Primus Thermocycler	MWG Biotech
Protean II Gelkammer	Biorad
Research®-Pipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100- 1.000 µl)	Eppendorf
Sequenzierer 3130xl Genetik Analyzer	ABI/Hitachi
Sicherheitswerkbank	Thermo
Spot Kamera, Version 3.1.2	Diagnostic Instruments
TaqMan Mx3000P	Stratagene
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge 5145	Eppendorf
Transmissionselektronenmikroskop 109	Zeiss
Überkopffrotierer	Heidolph Instruments
Ultrazentrifuge Centrikon T-1055	Kontron
UV-Schirm 302 nm	Bachofer
UZ-Rotoren TST-41, TST-60	Kontron
Vakuum-Geltrockner	von Keutz
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments

2.2 Chemikalien

Aceton	Merck Eurolab
β -Mercaptoethanol	Serva
Acetyl-CoA	Roche
Actinomycin D	Roth
Agarose, NA	Amersham Pharmacia Biotech
Agarose, ultrarein	Gibco BRL
Ammoniumsulfat (APS)	Biorad
Bacto-Agar	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Brilliant Blue	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau (BPB)	Serva
Chloroform	Roth
D-(+)-Saccharose	Roth
DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich
Deconex	Bohrer Chemie
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Eurolab
Dinatriummethylenediamintetraacetat (EDTA)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Biorad
Essigsäure	Roth
Ethanol abs. (EtOH)	Roth
Ethidiumbromid	Roche
Ethylacetat	Roth
Fluoprep	bioMérieux
Formaldehyd mind. 37 %	Merck Eurolab
Fugene [®] 6 Transfection Reagent	Roche
Gentamicin 10 mg/ml	Biochrom
Glycerol	Gibco BRL
Glycin	Roth
Isopropanol	Merck Eurolab
Kristallviolett	Roth
L-Glutamin 200 mM (100 \times)	Gibco BRL
Magermilchpulver	Töpfer
Methanol (MeOH)	Riedel-de-Haën
N(onidet)P40	Amersham Pharmacia Biotech
N, N, N', N', -	Biorad
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	
Natriumacetat (NaOAc)	Merck Eurolab
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Eurolab
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Eurolab
Natriumpyruvat 100mM	Biochrom
Nycodenz	Gentaur
Osmiumtetroxid	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Eurolab

Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco BRL
Pepton	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche
Polyacrylamid-Lösung (29:1)	Biorad
Poly-D-Lysin Hydrobromide	Sigma
Pyronin Y	Sigma-Aldrich
Rotiphorese® Gel 30	Roth
Sephadex® G-50 Superfine	Amersham Pharmacia Biotech
TransIT®- LT1 Transfection Reagent	Mirus
Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	Roth
Triton X-100	Serva

2.3 Verbrauchsmaterialien

25 cm ² Zellkulturflaschen	TPP
6 well-Zellkulturplatten	TPP
75 cm ² Zellkulturflaschen	TPP
Bio-Image Screen: Imaging plate 2040S	Fuji
Blottingpapier GB 002 (Whatman 3MM)	Whatman
DC-Platte	Roth
Falkon 15ml/ 50 ml	TPP
Gewebekulturröhrchen (Polystyrol)	Greiner
Immobilon™ P, PVDF-Membran	Millipore
Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Diagnostik
LumiNunc™ 96 well Plates Nunclon™	Nunc
LumiNunc™ 96 well Plates, schwarz	Nunc
LumiNunc™ 96 well Plates, weiß	Nunc
Microschraub Röhrchen 1,5 ml	Sarstedt
Nitrozellulose Membran Protran	Whatman® Schleicher & Schuell
Objektträger	Menzel
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR-tubes, 0,2 ml	Biozym
Petrischalen	TPP
Pipetten 10 ml, serological pipette	TPP
Pipetten 2 ml, serological pipette	TPP
Pipetten 25 ml, serological pipette	TPP
Pipetten 5 ml, serological pipette	TPP
Pipettenspitzen, oberflächenoptimiert	Nerbe Plus
Pipettenspitzen 0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl für Eppendorf research	Biozym
Polypropylen-Reaktionsgefäße	Greiner
Präzisions-Küvetten aus Quarzglas	Hellma
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Röntgenfilme RP New	CEA
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher und Schell

Ultra clear centrifuge tubes	Beckmann
Zellschaber	Sarstedt

2.4 Kits

E.Z.N.A. [®] Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab
CytoTox96 [®] Non-Radioaktiv Cytotoxicity-Assay	Promega
EnduRen [™] Live Cell Substrate	Promega
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Luciferase Assay System	Promega
MycoAlert [®] Mycoplasma Detection Assay	Cambrex
Omniscript RT Kit	Qiagen
QIAamp [®] Viral RNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Renilla Luciferase System	Promega
RNase-free DNase Kit	Qiagen
SuperSignal Ultra [®] West Dura Extended Duration Substrate	Pierce
SuperSignal Ultra [®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
Z-Competent E.coli Transformation Kit [™]	Zymo Research

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer

Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzanalysen	2 %	BSA
	5 %	Glycerol
	0,2 %	Tween 20
	0,05 %	NaN ₃
	in	PBS _{def}
Blockierungspuffer für Western Blot Analysen	10 g	Magermilchpulver
	ad 100 ml	PBS _{def}
DC-Laufpuffer	95 ml	Chloroform
	5 ml	Methanol
6x DNA-Probenpuffer	0,25 %	Bromphenolblau
	40 %	Saccharose
	10 %	Glycerol

10x TNEpuffer	100 mM 1500 mM 30 mM ad 1 l	Tris/HCL, pH 7,6 NaCl EDTA dH ₂ O
KoIP-Puffer (Koimmunpräzipitations-Puffer)	20 mM 100 mM 5 mM 1 % 1 mM 1 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 7,6 NaCl EDTA NP40 PMSF DTT PMSF
PBS _{def} , pH 7,5 (Phosphatpuffer deficient)	8 g 0,2 g 1,15 g 0,2 g ad 1 l	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ dH ₂ O
10x Proteingellaufpuffer	10 g 30 g 250 g ad 1 l	SDS Tris-Base Glycin dH ₂ O
4x Proteinprobenpuffer	10 ml 10 ml 15 ml 12,5 ml 1,25 ml ad 50 ml	Glycerin β-Mercaptoethanol 40 % SDS 3 M Tris-Base gesättigte BPB-Lösung in dH ₂ O dH ₂ O
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	2,52 ml 0,1 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 10 % SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	2,5 ml 0,1 ml	2,5 M Tris/HCl, pH 8,8 10 % SDS
Strippingpuffer für Western Blot	62,5 mM 2% 682 µl	Tris/HCl pH6,8 SDS Mercaptoethanol auf 100 ml
50x TAE, pH 8,0	242 g 57,1 g 100 ml ad 1 l	Tris-Base Essigsäure 0,5 M EDTA, pH 8,0 dH ₂ O
10x TBE, pH 8,0	108 g 55 g 40 ml ad 1 l	Tris-Base Borsäure 0,5 M EDTA, pH 8,0 dH ₂ O

Transferpuffer, für Western Blot	3 g 1,44 g 100 ml ad 1 l	Tris-Base Glycin Ethanol dH ₂ O
Western Blot-Antikörper- Verdünnungspuffer	1 % 0,1 % in	Magermilchpulver Tween 20 PBS _{def}

2.5.2 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg ad 1 ml	Ampicillin dH ₂ O
Fixierer/Entfärber für Proteingele	300 ml 100 ml 600 ml	Ethanol Essigsäure dH ₂ O
Coomassielösung	0,2 % 300 ml 100 ml 600 ml	Brilliant Blue Ethanol Essigsäure dH ₂ O
100 mM PMSF	360 mg ad 21 ml	PMSF Isopropanol
10 % SDS	100 g ad 1 l	SDS dH ₂ O

2.6 Wachstumsmedien

2.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Agar (1,5 %)	3,75 g ad 250 ml	Bacto-Agar LB-Medium
SOB-Medium	20 g 5 g 0,58 g 0,19 g 10 ml 10 ml ad 1 l	Pepton Hefeextrakt NaCl KCl 1 M MgCl ₂ 1 M MgSO ₄ dH ₂ O
LB-Medium	10 g 5 g 10 g ad 1 l	NaCl Hefeextrakt Pepton dH ₂ O

2.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)		Biochrom
Opti-MEM® I		Gibco
Trypsin/EDTA		Biochrom
DMEM(+++)	500 ml	DMEM
	50 ml	FCS (Fetales Kälberserum)
	5 ml	Natrium-Pyruvat
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml
DMEM(-)	500 ml	DMEM
	5 ml	Natrium-Pyruvat

2.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

2.7.1 Nukleinsäuren

1 kB DNA Ladder, 500 – 1002 bp	New England Biolabs
FastRuler DNA-Ladder	Fermentas

2.7.2 Nukleotide

dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat	10 mM	New England Biolabs
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat	10 mM	New England Biolabs
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat	10 mM	New England Biolabs
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat	10 mM	New England Biolabs

2.8 DNA-Oligonukleotide

alle Primer wurden von Invitrogen synthetisiert (Orientierung 5'→3')

Primer für Klonierungen / Sequenzierungen

Nr.	Name	Sequenz
2071	EBOV luc fw	GTT AAT ATT CTT GAA GAG ATG TCT CAT ACC ACC ATG ACT TCG AAA GTT TAT GAT CC
2072	EBOV luc rev	CAG GAT ACT ATG CGG CCG CTC TAG
2073	MARV leader fw	GCC CAG GTC GGA CCG CGA GG
2074	MARV leader rev	GTC ATG GTG GTA TGA GAC ATC TCT TCA AGA ATA TTA ACA GAC TGA CAA GTC TC
2087	VP35 myc	GGG GTA CCC CAT GGA ACA AAA ACT CAT CTC AGA AGA GGA TCT GAC AAC TAG AAC AAA GGG CAG GGG CC
2086	VP35 HA	GGG GTA CCC CAT GTA CCC ATA CGA TGT TCC AGA TTA CGC TAC AAC TAG ACC AAA GGG CAG GGG CC
1857	VP35 rev	CTA GCT AGC TAG TCA AAT TTT GAG TCC AAG TGT TTT ACC
1161	pCAGGS rev	CCA GCC ACC ACC TTC TGA TA
16	Seq L fw	GAA CAT AAG TGA TCC TCT CAC T
17	Seq L fw	CAC ATA GGT TCT GAT TTA GAG G
27	Seq L fw	CTG GAG GAC GGT TTC AAA T
28	Seq L fw	GAG CTG TTT GGA ATA GCA GA
64	Seq L fw	GAT GAA TCT TCT CAA AGT ACG GAT CCA ATA A
89	Seq L fw	GAC GGA TCC CCT CTA ATC AAC AAG TGA CCA ATT CGA
91	Seq L fw	GAC GGA TCC ACT TTT ATA GCC CAC CAC ATT GTG TGA
123	Seq L fw	TCA CTA GAT GCA CAT GAG GAC TTT GA
184	Seq L fw	TAT CAG CAT CTT TGG GAG TG
201	Seq L fw	AGA AGA TAA GAT CGG TTA TC
202	Seq L fw	AGA TAT TGC ATT GTC TCT TG
203	Seq L fw	AGC AAT GTC ACG CCA AAG AC
280	Seq L fw	GAC GCA GAG ACC ACC AAG GAT GAA ACA AGG
769	Seq L fw	GAA GGG GAA GGA AGT GGT GC

Primer für RealTime PCR

Name	Sequenz
Luc (-)	AGAACCATTACCAGATTTGCCTGA
Luc (+)	GGCCTCTTCTTATTTATGGCGA
Sonde	FAM-CCACATATTGAGCCAGTAGCGCGG-BBQ

2.9 Vektoren und rekombinante Plasmide

pTM1	B. Moss, Bethesda (USA)
pTM1-L	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-NP	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-VP35	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-VP30	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-T7	Y. Kawaoka, Wisconsin (USA)
3E-5E CAT	Y. Kawaoka, Wisconsin (USA)
3E-5E luc	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-EBOV-L	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-EBOV-NP	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-EBOV-VP35	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-EBOV-VP30	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-EBOV-VP24	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-EBOV-VP40	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-EBOV-GP	Institut für Virologie, Marburg
3M-5M CAT	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-MARV-L	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-MARV-NP	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-MARV-VP35	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-MARV-VP30	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-MARV-VP24	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-MARV-VP40	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-MARV-GP	Institut für Virologie, Marburg

kloniertes Plasmid	Matrizen-DNA	Herstellung
3M-5M luc	3M-5M CAT, 3E-5E luc	#2073/#2074 #2071/#2072
pCAGGS-VP35(myc)	pCAGGS-EBOV-VP35	#2087/#1857
pCAGGS-VP35(HA)	pCAGGS-EBOV-VP35	#2086/#1857

2.10 Proteine

2.10.1 Enzyme

Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (10 U/μl)	New England Biolabs
GoTaq® Flexi DNA-Polymerase	Promega
PfuTurboTM DNA-Polymerase (2.5 U/μl)	Stratagene
Platinum® Taq DNA-Polymerase	Invitrogen
Proteinase K	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Qiagen
RNasin Plus Rnase Inhibitor	Promega
SAWADY PWO DNA-Polymerase (1U/μl)	Peqlab Biotechnologie
T4 DNA-Ligase (4 U/μl)	New England Biolabs

2.10.2 Primäre Antikörper

anti-Flag® M2 monoklonaler AK (Maus)	Sigma-Aldrich
anti-GP [50-6-10], monoklonal (Maus)	Biogenes
anti-VP40 [40-2-2], monoklonal (Maus)	Biogenes
anti-VP40 konz. , monoklonal (Maus)	Biogenes
anti-NP [59], monoklonal (Maus)	Biogenes
anti-NP konz. , monoklonal (Maus)	Biogenes
anti-VP30 [11-6], monoklonal (Maus)	Biogenes
anti-VP35 [2], polyklonal (Meerschweinchen)	Institut für Virologie, Marburg
anti-VP24 [anti-GST], polyklonal (Kaninchen)	Institut für Virologie, Marburg
anti-Tubulin, monoklonal (Maus)	Sigma-Aldrich
anti-myc, polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz
MARV Serum [35-5], (Ziege)	Institut für Virologie, Marburg
MARV-NC, Kaninchen (1 M NaCl, 11.06.1996)	Institut für Virologie, Marburg

2.10.3 Sekundäre Antikörper

AlexaFluor® 680 Ziege anti-Maus IgG	Molecular Probes
AlexaFluor® 680 Esel anti-Ziege IgG	Molecular Probes
AlexaFluor® 680 Ziege anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes
IRDye™ 800 Ziege anti-Maus IgG	Rockland
IRDye™ 800 Esel anti-Ziege IgG	Rockland
IRDye™ 800 Ziege anti-Meerschweinchen IgG	Rockland
HRP Esel anti-Ziege	DAKO
POD Schwein anti-Kaninchen	DAKO
POD Kaninchen anti-Meerschweinchen	DAKO
POD Ziege anti-Maus	DAKO

2.10.4 Proteinmarker

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas
---	-----------

2.11 Radioaktiv markierte Substanzen

D-threo-[dichloroacetyl-1- ¹⁴ C]Chloramphenicol	Amersham Pharmacia Biotech
--	----------------------------

2.12 Zellen und Viren

2.12.1 Prokaryotische Zellen

E. coli Stamm XL1-Blue

Stratagene

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

2.12.2 Eukaryotische Zellen

293-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie transformiert mit adenoviraler (Ad5)–DNA
HUH7-Zellen	humane Hepatomazelllinie
Vero-Zellen	Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze

2.12.3 Viren

Marburg Virus (MARV-Musoke)

Institut für Virologie, Marburg

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode welche die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind, in vitro ermöglicht. Die Primer sind in der Regel zwischen 20 und 40 bp lang und definieren die Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Nicht komplementäre Sequenzen an den 5'-Enden der Primer erlauben das Anfügen von Restriktionsschnittstellen.

Eine typische PCR gliedert sich in einen Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritt: beim Denaturierungsschritt werden die beiden Stränge der Ausgangs-DNA (Template) bei 95 °C getrennt und beim Absenken der Temperatur im Zuge des Annealing kommt es zum Anlagern der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen auf den beiden Ausgangssträngen. Während der Elongation werden die 3'-Enden der Primer durch das Anlagern von Basen von der *Pwo*-Polymerase (oder *Pfu*-Polymerase) verlängert. Die *Pwo* ist eine thermostabile Polymerase, die neben ihrer 5'-3'-Polymeraseaktivität eine zusätzliche 3'-5'-Exonucleaseaktivität besitzt, also eine Korrekturlesefunktion (proofreading) hat und so die hohe Lesegenauigkeit der *Pwo* gewährleistet.

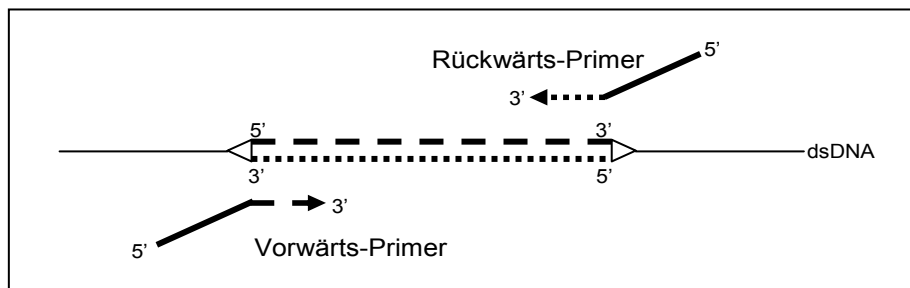


Abb.3.1: Prinzip einer PCR.

Der vergrößerte DNA-Abschnitt soll amplifiziert werden. Gleiche Linien stehen für gleiche Sequenzen, gestrichelte und gepunktete Bereiche, sofern sie einander gegenüberliegen, sind komplementär. Die Synthese erfolgt in 5'-3'-Richtung.

Die genannten Schritte werden 35 Zyklen wiederholt, wobei jede im Vorschritt synthetisierte DNA als Template dienen kann, was zur Verdopplung und so zum exponentiellen Zuwachs des Syntheseproduktes führt.

Programm:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
10	94 °C	15 s
	55 °C	30 s
	72 °C	2 min
20	94 °C	15 s
	50 °C	30 s
	72 °C	2 min + 20 sec pro Zyklus
1	72 °C	7 min

Reaktionsansatz:

10 µl	10 x <i>Pwo</i> -Reaktionspuffer
je 2 µl	10 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP
3 µl	10 pmol/µl Vorwärts-Primer
3 µl	10 pmol/µl Rückwärts-Primer
0,75 µg	DNA
2,5 µl	<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase (2,5U)
ad 100 µl	dH ₂ O

Die PCR-Probe wird im Anschluss über ein präparatives Gel (3.1.2.2) aufgereinigt.

3.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA und Visualisierung

DNA ist aufgrund der vorhandenen Phosphatgruppen negativ geladen, was ihre Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Die DNA wandert hierbei durch ein Agarosegel zur Anode, wobei die Siebstruktur der Agarose eine Auftrennung nach Molekülgröße erlaubt, da die Poren der Agarose kleineren Fragmenten weniger

Widerstand bietet. Zur Visualisierung wird der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid verwendet, der, eingelagert in die DNA, diese unter UV-Licht sichtbar macht. Standardgemäß werden zwei Arten von Agarosegelen verwendet: analytische und präparative. Analytische Gele werden zur Größenbestimmung verwendet; die DNA wird hierbei zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen, anhand dessen man die DNA-Fragmentgröße bestimmen kann. Präparative Gele werden zur Aufreinigung von DNA beispielsweise nach einer PCR verwendet.

3.1.2.1 analytisches DNA-Agarosegel

Diese Art der Auftrennung erfolgt in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) was eine schnelle und effektive Elektrophorese ermöglicht. 1% (w/v) Agarose ultrarein wird hierzu in TBE-Puffer aufgeköcht und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Polymerisieren des Gels können die DNA-Proben (ca. 5-10 µl), mit 1/6 Volumen 6 x DNA-Probenpuffer versetzt, zusammen mit einem Größenmarker aufgetragen werden. Die Auftrennung erfolgt mit TBE als Laufpuffer im elektrischen Feld bei ca. 90-120 V. Im Anschluss wird das Gel für etwa 30 min in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) schüttelnd gefärbt. Die Visualisierung erfolgt mit UV-Licht im Geldokumentationssystem GelDoc 2000.

3.1.2.2 präparatives DNA-Agarosegel

Bei dieser Elektrophorese wird TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) für das Gel und auch als Laufpuffer zusammen mit 1% (w/v) der sehr reinen Agarose NA verwendet. Die restliche Vorgehensweise entspricht dem analytischen Gel, nur dass das DNA-Auftragsvolumen bei bis zu 100 µl liegt und die Elektrophorese bei 70-90 V erfolgt. Nach Anfärben mit frischer Ethidiumbromidlösung wird die DNA unter dem UV-Schirm mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten.

3.1.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA aus präparativen DNA-Agarosegelen wird mit Hilfe des QIAquick™ Gel Extraction Kit extrahiert, wobei die DNA-Extraktion über eine Säulenmatrix erfolgt. Die Aufreinigung erfolgt entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung.

3.1.4 Restriktionsendonukleasebehandlung von DNA

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen erlaubt es, doppelsträngige DNA spezifisch an einer genau definierten Sequenz zu schneiden. So können sie verwendet werden um zum Beispiel PCR-Produkte und Vektoren für die Ligation (3.1.7) vorzubereiten, aber auch um DNA anhand der entstandenen Fragmente zu charakterisieren. Der Verdau erfolgt meist bei einer Temperatur von 37 °C für 2-4 h. Abweichende Temperaturen, entsprechende Pufferangaben und oft möglicher gleichzeitiger Verdau mit zwei Restriktionsenzymen sind den Herstellerangaben zu entnehmen. Es wird zwischen analytischem und präparativem Verdau wie folgt unterschieden:

analytischer Verdau:

0,1-1 µg	DNA
1 µl	10 x Restriktionspuffer
1 µl	10% BSA (falls notwendig)
1-5 U	Restriktionsendonuklease/n
ad 10 µl	dH ₂ O

präparativer Verdau:

5 µg	DNA
10 µl	10 x Restriktionspuffer
10 µl	10% BSA (falls notwendig)
10-50 U	Restriktionsendonuklaese/n
ad 50 µl	dH ₂ O

Nach dem präparativen Verdau wird die DNA über ein präparatives Gel (3.1.2.2) aufgereinigt.

3.1.5 Reinigung von DNA

Das Weiterverwenden von DNA, beispielsweise nach einer Restriktionsendonukleasebehandlung (3.1.4), für Folgeexperimente macht eine Trennung der DNA von Enzymen, Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA, Detergenzien,

Salzen oder Proteinen notwendig, da diese sich negativ auf den Verlauf nachfolgender biochemischer Reaktionen auswirken können.

Hierzu kann das QIAquick™ PCR Purification Kit verwendet werden, bei dem DNA-Fragmente über 100 bp an eine Säulenmatrix gebunden und gereinigt werden. Das genauere Vorgehen ist den Herstellerangaben zu entnehmen. Die Elution erfolgt in der Regel mit 30 µl dH₂O.

3.1.6 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Geschnittene, linearisierte Vektor-DNA muss im Zuge des Klonierungsverfahrens dephosphoryliert werden, da der Vektor sonst religieren würde. Hierzu wird der Vektor mit alkalischer Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) behandelt, die die 5'-Phosphatgruppen des Vektors entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgt für 2-4 h bei 37 °C und kann daher oft dem Restriktionsverdau (3.1.4) zugesetzt werden. Stimmen die Temperatur und Pufferbedingungen von Restriktionsverdau und CIP-Behandlung nicht überein, erfolgen die Schritte nacheinander. Nach der Dephosphorylierung und vor der Ligation empfiehlt sich eine Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit (3.1.5).

Dephosphorylierungsansatz:

30 µl	Vektor-DNA nach Restriktionsverdau (3.1.4) und DNA-Aufreinigung (3.1.5)
5 µl	10 x NEB Puffer 3
2 µl	CIP (1 U/µl)
ad 50 µl	dH ₂ O

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren

Das Enzym T4-DNA-Ligase ermöglicht die kovalente Verknüpfung eines restriktionsendonukleasebehandelten DNA-Fragmentes (Insert) mit einem linearisierten, dephosphorylierten Vektor, indem Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat-Gruppe an den Enden des DNA-Fragmentes und den 3'-OH Gruppen am Vektor gebildet werden. Die Ligation erfolgt bei Raumtemperatur für 45 min.

An dieser Stelle empfiehlt es sich, eine Religationskontrolle mitzuführen, bei der statt Insert nur dH₂O dem Ansatz zugegeben wird. So ist eine Abschätzung des Ligationserfolgs anhand des Verhältnisses zwischen religierten Vektoren und Insert enthaltenden Vektoren möglich.

Im Anschluss erfolgt die Transformation in Z-kompetente XL-1 Blue Zellen (3.1.8).

Ligationsansatz:

ca. 0,05 µg	linearisierter, dephosphorylierter Vektor
0,15-0,25 µg	DNA-Fragment (restriktionsverdaut)
1 µl	10 x T4 Ligationspuffer (enthält rATP)
0,5 µl	T4 DNA-Ligase (4 U/µl)
ad 10 µl	dH ₂ O

3.1.8 Transformation von Plasmiden in Z-kompetente XL-1 Blue Zellen

Mit dem Z-Competent E. coli Transformation Kit™ and Buffer Set wurden E. coli-Zellen laut beiliegendem Protokoll behandelt, aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

Die chemisch kompetenten XL-1 Blue Bakterienzellen werden vor Verwendung zügig aufgetaut und sind dann in der Lage Fremd-DNA in Form von Plasmiden aufzunehmen. Zu diesem Zweck werden 100 µl Zellsuspension mit der Plasmid-DNA für 1 h auf Eis inkubiert. Nach der erfolgten Ligation (3.1.7) kann der gesamte Ansatz der Zellsuspension zugesetzt werden. Als Transformationskontrolle wird in der Regel der Ansatz zusätzlich noch mit zirkulärer Vektor-DNA, in welche kein Insert eingebracht wurde, durchgeführt.

3.1.9 Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterienzellen

Um nach der Transformation (3.1.8) Bakterienzellen mit eingebrachtem Plasmid von solchen zu unterscheiden, die kein Plasmid enthalten, werden Antibiotikaresistenzen genutzt. Die eingebrachten Plasmide enthalten ein Antibiotikaresistenz-Gen, z.B. gegen Ampicillin. Werden die Bakterienzellen auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert (100 µg/ml) und über Nacht bei 37 °C inkubiert, so bilden nur die Bakterienzellen

Kolonien, welche das gewünschte Plasmid enthalten und dadurch das Ampicillinresistenzgen exprimieren.

3.1.10 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab

Bei der DNA-Isolierung im kleinen Maßstab werden 3 ml ampicillinhaltiges LB-Flüssigmedium (100 µg/ml) mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zur Freisetzung der Plasmide wird das Prinzip der alkalischen Lyse angewandt und die DNA anschließend an eine Säulenmatrix gebunden und gereinigt. Hierzu wird das E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I entsprechend der Herstellerangaben verwendet; die Elution erfolgt in 50 µl dH₂O. Qualitative und quantitative Kontrolle erfolgt mit dem Photometer (3.1.12). Um das Einbringen des Inserts in den Vektor zu überprüfen, werden 5 µl für einen analytischen Restriktionsverdau (3.1.4) eingesetzt. Durch Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme kann dann im analytischen Agarosegel (3.1.2.1) anhand des auftretenden Bandenmusters die erfolgreiche Klonierung kontrolliert werden.

3.1.11 Plasmidpräparation im großen Maßstab

Die Isolierung im großen Maßstab gleicht der des kleinen Maßstabs in den meisten Punkten. Hierfür werden 100 ml ampicillinhaltiges LB-Flüssigmedium mit einer Kolonie oder auch mit 100 µl einer Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Plasmid-Isolierung erfolgt mit dem Qiagen HiSpeed[®] Plasmid Maxi Kit nach Protokollvorschrift; die Elution erfolgt in 1 ml dH₂O. Qualitative und quantitative Kontrolle der Plasmid-DNA erfolgt wie bei Isolation in kleinem Maßstab mit dem Photometer (3.1.12).

3.1.12 Konzentrationsbestimmung von DNA mit dem Photometer

Um die zuvor isolierte DNA zu quantifizieren, aber auch um Ihre Qualität zu überprüfen wird die DNA-Lösung photometrisch mit dem *GeneQuant pro* Photometer gemessen. Die Messung erfolgt in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Absorption von 260 nm, da in diesem Bereich die Absorption von doppelsträngiger DNA liegt (DNA-Konzentration C in µg/ml = $E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$). Um die Extinktion

im linearen Bereich (zwischen 0,01 und 0,8) zu halten wird die DNA-Lösung entsprechend verdünnt.

Der Quotient OD_{260}/OD_{280} erlaubt eine Aussage über die Reinheit von Nukleinsäurepräparationen. Reine Lösungen sind durch Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 charakterisiert. Verunreinigungen durch Proteine ergeben einen Wert kleiner als 1,8; Kontaminationen durch Phenol oder RNA hingegen ergeben deutlich höhere Quotienten.

3.1.13 Ortsgerichtete Mutagenese

Mittels in vitro Mutagenese ist es möglich, Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in Plasmid-DNA einzubringen. Die Methode beruht auf einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit speziell entworfenen, zueinander komplementären Primern, welche die gewünschte Mutation enthalten.

Die Plasmid-DNA wurde mit den entsprechenden Primern durch rekombinante PfuTurboTM-DNA-Polymerase amplifiziert, wobei die Amplifikate die durch die Primer eingeführten Mutationen enthalten. Im Anschluss wird das Restriktionsenzym Dpn1 zugeführt und die Reaktion 2-4 h bei 37 °C inkubiert. Dpn1 baut nur methylierte DNA vollständig ab und so wird die Ausgangs-DNA, die ja aus Zellen isoliert wurde und daher eine Methylierung aufweist, nicht aber die neusynthetisierte DNA mit der gewünschten Veränderung aus der Lösung entfernt. 5 µl hiervon werden dann in Z-kompetente XL1 Blue Zellen transformiert und ausplattiert. Nach der Isolation der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (3.1.10), wird per Sequenzierung (3.1.16) überprüft, ob die gewünschte Basenveränderung vorliegt.

Reaktionsansatz:

5 µl	10 x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer
je 1 µl	dATP, dTTP, dGTP, dCTP (10 mM)
125 ng	Vorwärtsprimer
125 ng	Rückwärtsprimer
75 ng	zu ändernde Plasmid-DNA
1 µl	<i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase (2,5 U/µl)
ad 50 µl	dH ₂ O

Programm:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95 °C	30 s
16 (da 3 bp)	95 °C	30 s
	55 °C	1 min
	68 °C	14 min (2 min/kb)

3.1.14 Rekombinante PCR

Mit Hilfe der rekombinanten PCR können lange Polynukleotide aus einer DNA- Sequenz z.B. eines Plasmids (hier Template A) in eine Sequenz eines anderen Plasmids (hier Template B) eingefügt werden (Abb. 3.2) (Higuchi et al., 1988).

Dafür werden zuerst mittels PCR (3.1.1) diejenigen DNA-Sequenzen aus Template A und B amplifiziert, die dann mittels einer rekombinanten PCR zusammengefügt werden sollen. Die Primer werden dabei so gewählt, dass der Vorwärtsprimer des Templates B und der Rückwärtsprimer des Templates A neben den spezifischen Sequenzen, die zur Hybridisierung mit der DNA benötigt werden, an ihren 5'-Enden Sequenzen beinhalten, die flankierenden Sequenzen des jeweils anderen Templates entsprechen.

In der rekombinanten PCR können während der Denaturierung die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen DNA des Templates A und B hybridisieren. Die Synthese des Doppelstranges erfolgt vom 3'-Ende des überlappenden Bereichs aus, so dass ein Produkt bestehend aus Sequenzen der Templates A und B entsteht. Die durch die *Pwo* DNA-Polymerase aufgefüllten Fragmente können nach Zugabe der beiden äußersten Primer, die während der ersten PCR verwendet wurden, als Template zur weiteren Amplifikation verwendet werden.

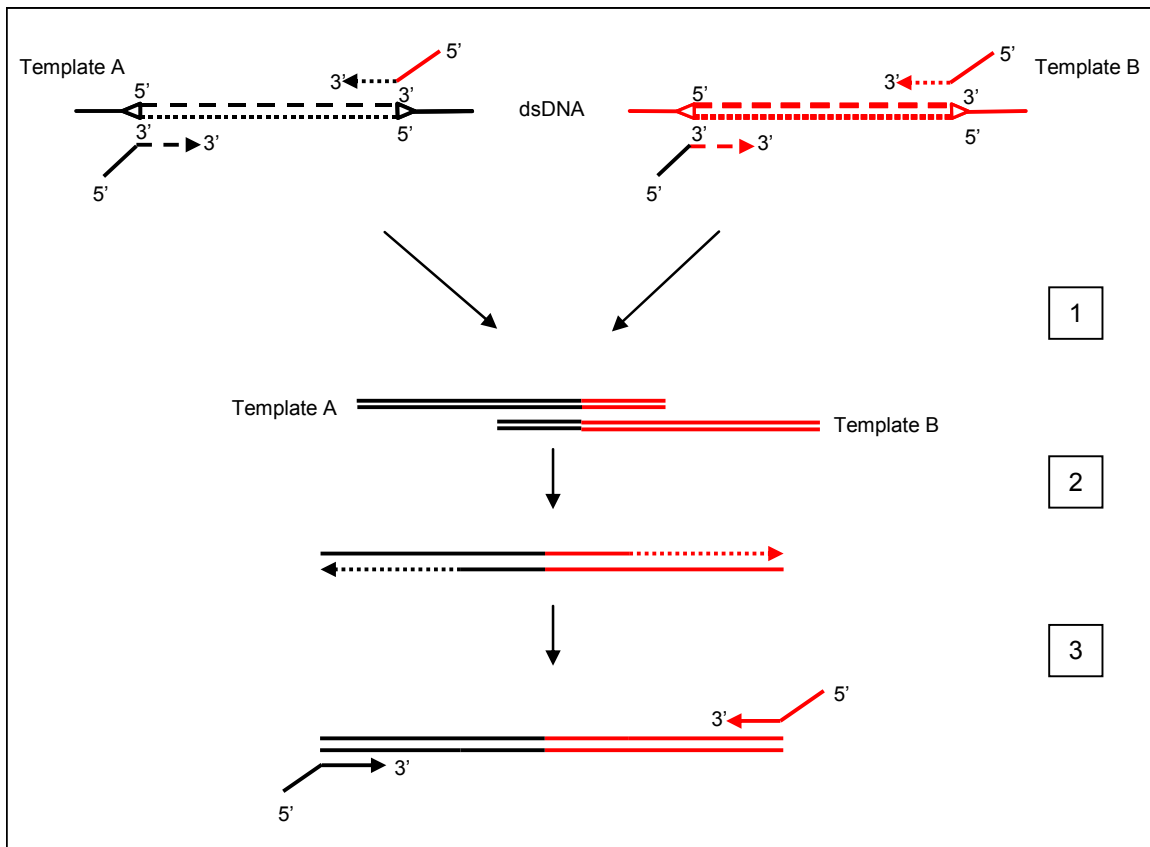


Abbildung 3.2: Prinzip der rekombinanten PCR

Bei der ersten PCR werden zwei DNA-Fragmente mit teilweise komplementären DNA-Abschnitten hergestellt. Während der rekombinanten PCR kommt es zur Hybridisierung (1) der komplementären Sequenzen und Auffüllen durch die DNA-Polymerase (2). Durch Zugabe der Primer (3) dient das Hybrid aus Fragmenten von Template A und B als Template zur Amplifikation neuer DNA.

Reaktionsansatz:

10 µl	Template A (PCR-Produkt Fragment 1)
10 µl	Template B (PCR-Produkt Fragment 2)
je 3 µl	dATP,dTTP,dGTP,dCTP (10 mM)
10 µl	10x PWO-Reaktionspuffer
ad 89 µl	H ₂ O

Programm Teil 1:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	99 °C	3 min

→ 1 µl *Pwo*-Polymerase hinzufügen

Programm Teil 1:

Zyklen	Temperatur	Zeit
10	95 °C	1 min
	37°C	1 min
	72°C	5 min

→ durch diesen Schritt werden die Templates aufgeschmolzen und können über die komplementäre Sequenz hybridisieren. Es werden jeweils 5 µl (10 pmol/µl) der äußeren Primer hinzugefügt und durch den folgenden PCR-Schritt die chimäre cDNA amplifiziert.

Programm Teil 2:

Zyklen	Temperatur	Zeit
30	95 °C	1 min
	55 °C	1 min
	72 °C	5 min
1	72 °C	5 min

3.1.15 RealTime-PCR (Echtzeit-PCR)

Für die quantitative Bestimmung viraler Genom-Kopien in iVLPs wird das Prinzip der RealTime-PCR (Echtzeit-PCR) verwendet. Diese Methode setzt sich aus zwei Schritten zusammen: im ersten Schritt wird die zuvor aus iVLPs isolierte RNA (3.2.8) mit Hilfe der im Omniscript RT-Kit (Qiagen) enthaltenen Reverse Transkriptase nach

Herstellerangaben in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Das dabei hinzugefügte RNasin dient dem Schutz der RNA vor RNA-abbauenden RNasen.

Reaktionsansatz:

	2 µl	10x Omniscript-Puffer
	2 µl	dNTP-Mix
	2 µl	Primer Luc (-) (10µM)
	1 µl	RNasin Plus RNase Inhibitor
	1 µl	Reverse Transkriptase
	10 µl	RNA
ad	20µl	H ₂ O (RNase frei)

Programm:

Temperatur	Zeit
37 °C	60 min
93 °C	5 min

Das Amplifikat kann dann für den zweiten Schritt der Quantifizierung verwendet werden. Hierbei wird die cDNA unter Verwendung der Platinum Taq DNA-Polymerase amplifiziert. Gleichzeitig wird als DNA-Standard eine Verdünnungsreihe definierter Menge von 3M-5M luc mitgeführt, um die Kopienzahl des Amplifikates zu errechnen. Durch Zugabe einer fluoreszierenden sequenzspezifischen Sonde ist es möglich, die Entstehung der PCR-Produkte in Echtzeit zu verfolgen und die Kopienanzahl anhand des Standards zu errechnen.

Reaktionsansatz:

2,5 µl	10x Polymerase-Puffer
2 µl	MgCl ₂
2 µl	dNTP-Mix (2,5 mM)
0,75 µl	Primer Luc (-) (10µM)
0,75 µl	Primer Luc (+) (10µM)

	0,25 µl	Sonde (10µM)
	0,25 µl	ROX
	5 µl	RNA
	0,1 µl	Platinum Taq DNA-Polymerase
ad	25µl	H ₂ O (RNase frei)

Programm:

Zyklen	Temperatur	Zeit
	95 °C	10 min
45	95 °C	15 s
	60 °C	35 s

Die Messung der Fluoreszenz erfolgt mit dem TaqMan Mx3000P von Stratagene unter Verwendung des Programms MxPro 4.0.

3.1.16 DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson (Sanger and Coulson, 1975) und wird an einem Sequenzer unter Verwendung des BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Proben zur Sequenzierung werden nach folgendem Reaktionsansatz behandelt:

200 ng	DNA
0,5 µl	Primer (10 pmol/µl)
2 µl	Big Dye 3.1
1 µl	5 x Sequenzierpuffer
ad 10 µl	H ₂ O

Programm:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	96 °C	1 min
25	96 °C	10 s
1	55 °C	5 s
1	60 °C	4 min

Die Aufreinigung und Weiterverarbeitung der Proben erfolgt im Servicelabor des Robert Koch-Instituts mit dem 3130xl Genetik Analyzer.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von HUH7- und 293-Zellen

Bei den verwendeten humanen Hepatozytenzellen (HUH7) und humanen embryonalen Nierenzellen (293) handelt es sich um permanente Zelllinien, die in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C unter 5% CO₂-Begasung kultiviert werden. Das Passagieren der Zellen erfolgt im Abstand von 3-4 Tagen unter der Sicherheitswerkbank, wobei als Wachstumsmedium DMEM (+++) wird. Vom konfluenten Zellrasen wird der Kulturüberstand entfernt und der am Boden der Kulturflasche haftende Zellrasen mit vorgewärmten (37°C) PBS_{def} gewaschen. Im Anschluss werden 2 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben und die Zellen darin inkubiert, was ein Ablösen des Zellrasens zur Folge hat. Zu beachten ist, dass die Zeit bis zum Ablösen der Zellen bei verschiedenen Zelllinien unterschiedlich lang ist. Während 293-Zellen sich bereits nach wenigen Sekunden ablösen, kann dieser Vorgang bei HUH7-Zellen bis zu mehreren Minuten dauern. Eine permanente Kontrolle unter dem Mikroskop ist daher unabdinglich. Nach Ablösen der Zellen wird die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 8 ml DMEM (+++) gestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Pippetieren resuspendiert. Die gewünschte Verdünnung in DMEM (+++) wird in neue Zellkulturflaschen oder 6-Lochplatten ausgesät.

Da 293-Zellen sich besonders leicht vom Boden der Zellkulturflasche ablösen, werden diese Zellen in 6-Lochplatten ausgesät, die mit poly-L-Lysin beschichtet worden sind. Hierzu wird in jedes Loch der Platte vor Beginn des Passagierens je 1 ml poly-L-Lysin (1 mg/ml) pipettiert und die Zellkulturplatte 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das bis zu fünfmal wieder verwendbare poly-L-Lysin wird im Anschluss abgenommen und bei -20 °C gelagert. Nach dreimaligem Waschen der 6-Lochplatte mit PBS_{def} werden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät. Dieses Verfahren gewährleistet ein festeres

Anhaften der Zellen am Boden der Zellkulturplatte und erleichtert so deren Handhabung bei nachfolgenden Experimenten.

3.2.2 Transiente Transfektion von HUH7 und 293-Zellen mit Fugene®

293- und HUH7-Zellen werden mit dem Fugene® Reagenz nach Herstellerangaben transfiziert. Hierbei wird die Maskierung des negativgeladenen Phosphatrückgrats der DNA durch die in Fugene® enthaltenen kationische Lipide genutzt. Die Konfluenz der Zellen sollte zum Transfektionszeitpunkt 70% betragen.

Die Zellen werden zu Beginn der Transfektion einmal mit vorgewärmten OptiMEM Medium gewaschen und sollten in diesem Medium mindestens 30 min inkubiert werden. Es wird folgender Ansatz vorbereitet:

Ansatz: 200 µl OptiMEM
 + x µg DNA
 + 3 µl Fugene® pro µg DNA

Der Reaktionsansatz wird 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zellmedium wird gegen frisches OptiMEM ausgetauscht und der Transfektionsansatz hinzugegeben. Die Transfektion erfolgt über Nacht (12 bis 14 h) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung. Am Folgetag wird das Medium bei 293-Zellen gegen DMEM (+++) ausgetauscht (3ml pro Loch) und die Zellen nach 65 h lysiert (3.2.3, 3.2.4) und der Überstand ultrazentrifugiert (3.2.6). Transfizierte HUH7-Zellen werden am nächsten Tag für die Infektion (3.2.7) verwendet.

3.2.3 Zellernte für CAT-Reporterassay

Zur Durchführung einer CAT-Reportergenanalyse werden 293-Zellen 48 h nach der Transfektion (3.2.2) zunächst zweimal mit eiskaltem PBS_{def} gewaschen und für 15 min in 150 µl 1x Reporter-Lysis-Puffer auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Zelldebris und Zelllysate werden im Anschluss in ein Reaktionsgefäße überführt und nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 10.000 UpM werden die Zelllysate für die Bestimmung der CAT-Aktivität (3.3.9) oder eine Western Blot Analyse verwendet (3.3.3).

3.2.4 Zellernte für Luziferaseassay und elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Lyse der 293- und der HUH7-Zellen, mit denen ein Luziferaseassay (3.3.8) durchgeführt wird, erfolgt 65 h nach der Transfektion bzw. Infektion (3.2.7). Hierzu werden die Zellen in der 6-Lochplatte einmal mit kaltem PBS_{def} gewaschen, in PBS_{def} mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 2500 Upm werden die Zellen pelletiert und nach Entfernen des Überstandes in jedes Reaktionsgefäß 300 µl des 1x Reporter Lysis Puffer bzw. Passive Lysis Puffer (Promega) gegeben. Eine Inkubation von 20 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur führt zum Aufschluss der Zellen. Schließlich erfolgt ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 14.000 Upm. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bis zur Durchführung des Luziferaseassays (3.3.8) oder der elektrophoretischen Auftrennung (3.3.1) bei –20 °C gelagert werden. Um eine Western Blot Analyse (3.3.3; 3.3.4) vorzunehmen, werden 15 µl des Zelllysates oder alternativ 15 µl der aufgereinigten iVLPs (3.2.6) mit 5 µl 4 x Proteinprobenpuffer vermischt und anschließend für 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um die Proben für die SDS-PAGE (3.3.1) nutzbar zu machen.

3.2.5 Herstellung von MARV Antigen

Kultivierte, zu 80 % konfluente Vero-Zellen werden unter BSL-4 Bedingungen in 175 cm²-Zellkulturflaschen mit MARV-Musoke infiziert (multiplicity of infection (moi) = 0,01). Die Zellen werden mit 10 ml einer entsprechenden Virusverdünnung inokuliert und für 1 h bei 37 °C (5 % CO₂) im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss werden 30 ml DMEM (2 % FCS) zugegeben und bis zum Auftreten eines zytopathischen Effekts bei 37 °C (5 % CO₂) im Brutschrank aufbewahrt. Sieben bis acht Tage nach Infektion werden die Überstände geerntet. Die Viren werden, wie bei Funke et al. beschrieben, aufgereinigt (Funke et al., 1995). Um außerhalb eines Labors der Sicherheitsstufe 4 mit MARV-Präparationen arbeiten zu können, werden diese mittels γ-Bestrahlung oder durch die

Zugabe von SDS mit einer (Endkonzentration: 1 %) und zehnminütiges Kochen inaktiviert.

3.2.6 Herstellung und Aufreinigung von iVLPs

Zur Herstellung von MARV- bzw. EBOV-spezifischen iVLPs werden zu 70% konfluente 293-Zellen in 6-Lochplatten mit pCAGGS-Expressionsplasmiden kodierend für alle viralen Proteine, pCAGGS-T7 und einem Minigenom (3M-5M Luc; 3M-5M CAT; oder 3E-5E Luc) mittels Fugene® transfiziert (3.2.2).

Ansatz pro Loch der Platte (µg der pCAGGS- Plasmide):

	MARV	EBOV
Minigenom	1 µg	0,25 µg
T7	0,5 µg	0,25 µg
L	1 µg	1 µg
NP	0,5 µg	0,125 µg
VP35	0,1 µg	0,125 µg
VP30	0,1 µg	0,075 µg
VP24	0,07 µg	0,03 µg
VP40	0,5 µg	0,25 µg
GP	0,5 µg	0,25 µg

Nach einer Inkubation von 65 h werden Zellen und Zellkulturüberstand getrennt. Die Zellen werden lysiert und für einen Luziferase-Reporterassay (3.3.8) verwendet. Der Zellkulturüberstand wird zunächst durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 2500 Upm von Zelldebris gereinigt. Anschließend wird der Überstand auf ein Sukrose-Kissen (20% in TNE) geschichtet und in einem SW40 Rotor bei 36.000 Upm für 3 h bei 4°C ultrazentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet in 50 µl PBS_{def} aufgenommen und kann für Infektionen (3.2.7), Western Blot Analyse (3.3.4), Proteinase K-Verdau (3.3.11), Elektronenmikroskopie (3.3.12) oder RNA-Isolation (3.2.8) verwendet werden.

3.2.7 Infektion von HUH7-Zellen mit iVLPs

HUH7-Zellen, die zu einer Dichte von 70% Konfluenz in 6-Lochplatten gewachsen waren, werden im Vorfeld einer Infektion mit MARV iVLPs zunächst mit 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35 und 0,1 µg pCAGGS-VP30 pro Loch einer 6-Lochplatte transfiziert (3.2.2), was eine Erhöhung der detektierbaren Reporterogenaktivität in den infizierten Zellen zur Folge hat. 16 h nach der Transfektion wird das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen einmal mit 2 ml DMEM (-) gewaschen. Die Infektion erfolgt für 1,5 h bei 37°C und 5% CO₂ in 500 µl DMEM (-) dem die gereinigten iVLPs (3.2.6) zugefügt werden. Im Anschluss werden 2,5 ml DMEM (-) und 1 ml DMEM (10% FCS) hinzu gegeben und die Zellen für 65 h inkubiert. Schließlich folgen die Lyse der Zellen (3.2.4) und eine zweite Luziferasereporter-Messung (3.3.8).

3.2.8 RNA-Isolierung aus iVLPs

Um die Konzentration der in iVLPs integrierten Minigenome in einer RealTime-PCR zu quantifizieren, wird die RNA zunächst aus den iVLPs, welche wie in 3.2.6 beschrieben hergestellt wurden, mittels des QIAmp Viral RNA Mini-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgt in 41,5 µl RNase-freiem H₂O. Um eventuell vorhandene DNA zu entfernen, wird ein DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierzu wird die eluierte RNA mit 5µl 5x DNase-Puffer und 3,5 µl DNase vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Inaktivierung erfolgt über einen 15-minütigen Hitzeschritt bei 70°C, wonach die RNA bei -80°C gelagert wird.

3.2.9 Bestimmung der minimalen infektiösen Dosis der iVLPs

Um die minimale infektiöse Dosis der hergestellten iVLPs zu bestimmen, d.h. diejenige Verdünnung, bei der noch ein detektierbares Reportersignal zu finden ist, werden Verdünnungsreihen der iVLPs hergestellt.

Hierzu wird eine 75 cm²-Zellkulturflasche transfiziert (3.2.2), die iVLPs aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation aufgereinigt (3.2.6) und das iVLP-Pellet in 1 ml

DMEM (-) aufgenommen. Zu infizierende HUH7-Zellen werden in 25 cm²-Zellkulturflaschen angezogen und bei einer Konfluenz von 70% mit pCAGGS-L, pCAGGS-NP, pCAGGS-VP35 und pCAGGS-VP30 vortransfiziert (3.2.2). 16 h nach der Transfektion werden die Zellen mit PBS_{def} gewaschen und im Anschluss mit 1 ml Trypsin /EDTA inkubiert, bis sich die Zellen ablösen. Durch Zugabe von 11 ml DMEM (5% FCS) wird die Trypsinaktivität gestoppt. Es werden 0,2 ml Zellsuspension in jedes Loch einer 96-Loch-Luminometerplatte ausgesät. Als Kontrolle werden zusätzlich einige Löcher einer transparenten 96-Lochplatte befüllt, was eine optische Kontrolle der Zellen während des gesamten Versuchsablaufs ermöglicht. Nach etwa 2-3 h haben sich die Zellen abgesetzt und das Medium kann entfernt werden. Die Zellen werden mit 100 µl der iVLP-Verdünnung für 1,5 h inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit 0,2 ml DMEM (5% FCS) überschichtet und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Auswertung der Reporterogenaktivität erfolgt mit dem „EnduRen™ Life cell substrate“ (Promega). Die Reporterogenaktivität pro iVLP-Verdünnung wird dabei viermal gemessen und zusammen mit den Werten der Vierfachbestimmung zu einem gemeinsamen Mittelwert verrechnet. Die iVLP-Verdünnung, bei der noch ein gut vom Hintergrund unterscheidbares Reportersignal gemessen werden kann, ergibt die minimale infektiöse VLP-Dosis. Zur statistischen Absicherung der Befunde werden die Bestimmung im Vierfachansatz durchgeführt.

3.2.10 Neutralisationsassay

Das iVLP-System kann verwendet werden, um die neutralisierenden Eigenschaften von Antikörpern und Seren zu untersuchen. Hierzu werden verschiedene Verdünnungen des zu testenden Antikörpers oder Serums mit der in 3.2.9 ermittelten minimalen infektiösen Dosis der iVLPs für 1,5 h schüttelnd bei RT inkubiert und im Anschluss auf HUH7-Zellen gegeben, die wie in 3.2.2 beschrieben transfiziert und in 96-Lochplatten ausgesät wurden. Nach einer 1,5-stündigen Infektion wird das Medium entfernt, 0,2 ml DMEM (5% FCS) hinzugegeben und die Zellen für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei der anschließenden Bestimmung der Reporterogenaktivität lassen sich neutralisierende Eigenschaften und die für die Neutralisation notwendige Antikörperkonzentration bestimmen.

3.2.11 Gradientenzentrifugation

Zur Unterscheidung bzw. Auftrennung der freigesetzten iVLPs hinsichtlich ihrer filamentösen oder sphärischen Form wird eine Gradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu werden zunächst 293-Zellen wie 3.2.6 beschrieben transfiziert und für 72 h inkubiert. Der Zellkulturüberstand wird zunächst durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2500 Upm von Zelldebris gereinigt. Anschließend wird der Überstand auf ein Sukrose-Kissen (20% in TNE) geschichtet und in einem SW40 Rotor bei 36.000 Upm für 3 h bei 4°C ultrazentrifugiert. Die gereinigten Partikel werden in jeweils 200 µl TNE-Puffer aufgenommen und die anschließende Auftrennung von filamentösen und sphärischen Partikeln erfolgt über einen Nycodenzgradienten, der sich aus sieben Schichten [von unten nach oben: 30% (730 µl), 20%, 15%, 10%, 7.5%, 5%, 2.5% (jeweils 490 µl) Nycodenz in TNE] zusammensetzt, in einem SW60 Rotor bei 16.000 Upm für 15 min bei 4°C. Es werden jeweils Fraktionen von 500 µl von oben nach unten abgenommen (Fraktionen 1-3: sphärische Partikel, Fraktionen 4-6: filamentöse Partikel). Es folgt eine weitere Ankonzentration der Partikel durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt in einem TLA 55 Rotor bei 45.000 Upm für 2 h bei 4°C. Das entstandene Pellet, in dem Membranen und mit Membranen assoziierte Proteine ankonzentriert wurden, wird in jeweils 100 µl TNE aufgenommen (Kolesnikova et al., 2009). Dabei werden 25 µl für elektronenmikroskopische Analyse (3.3.12), 25 µl für die Infektion von HUH7-Zellen (3.2.7) und 20 µl für einen ProteinaseK-Verdau (3.3.11) und anschließende Western Blot Analyse (3.3.3; 3.3.4) verwendet.

3.2.12 Inkubation von iVLPs mit einem Protein aus humanem Samen bzw. Samen und Samenflüssigkeit

Um den Einfluss eines Proteins aus humanem Samen (Semen-derived Enhancer of Virus Infection“ [SEVI]) auf die Infektiosität von iVLPs zu untersuchen, werden MARV bzw. EBOV iVLPs mit unterschiedlichen Mengen des Proteins inkubiert und der Einfluss auf die Infektion anhand des Reportersignals infizierter HUH7-Zellen quantifiziert. Hierzu werden 55 µl DMEM (-), 35 µl der iVLP-Verdünnung und 10 µl SEVI (Endkonzentration 50 µg/ml, 10 µg/ml, 2 µg/ml, 0.4 µg/ml, 0 µg/ml) gemischt, 10 min bei RT inkubiert und

im Anschluss auf HUH7-Zellen gegeben, die wie in 3.2.9 in 96-Lochplatten ausgesät wurden. Nach 2 h wird das Medium entfernt und durch 200 µl DMEM (5% FCS) ersetzt, die Zellen für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert und die Reporterogenaktivität schließlich mit dem „EnduRen™ Life cell substrate“ (Promega) ermittelt.

Um den Einfluss von Samen bzw. Samenflüssigkeit zu untersuchen wird Samen zunächst mit 50 µg/ml Gentamicin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt. Durch einen 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 10.000 Upm und 4°C werden Samen und Samenflüssigkeit voneinander getrennt. Die Flüssigkeit wird steril filtriert, der Samen in der gleichen Menge PBS_{def} aufgenommen und mit den zuvor beschriebenen Antibiotika versetzt. Es werden 40 µl verschiedener EBOV iVLP-Konzentrationen mit 50%, 10%, 2%, 0.4% und 0% Samen bzw. Samenflüssigkeit vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Im Verhältnis 1:30 mit Medium gemischt werden diese auf ausgesäte HUH7-Zellen gegeben (3.2.9) und für 2h inkubiert. Im Anschluss wird das Medium durch 0,2 ml Gentamicin-haltiges DMEM (5% FCS) ersetzt, für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und die Reporterogenaktivität mit „EnduRen™ Life cell substrate“ (Promega) ermittelt.

3.2.13 Inkubation von iVLPs mit Carboxyclic 3-deaza-adenosin, Interferon, 3-deaza Neplanocin A und Ribavirin

Um den Einfluss von Carboxyclic 3-deaza-adenosin, Interferon, 3-deaza Neplanocin A und Ribavirin auf die Infektiosität von MARV iVLPs zu charakterisieren, werden verschiedene Konzentrationen der Substanzen mit unterschiedlichen Verdünnungen der iVLPs inkubiert. Hierzu werden zunächst HUH7-Zellen, wie in 3.2.9 beschrieben in 96-Loch-Luminometerplatten in einem Volumen von 50 µl ausgesät (10.000 Zellen/Loch der Platte). Nach ca. 1,5 h werden 50 µg/ml, 10 µg/ml, 2µg/ml und 0.4 µg/ml Carboxyclic 3-deaza-adenosin, 3-deaza Neplanocin A und Ribavirin und 10000 U, 2000 U, 400 U und 80 U Interferon in den Überstand gegeben. Anschließend werden die iVLPs mit den Verdünnungen 1:100, 1:75 und 1:50 in einem Volumen von 50 µl zu den Zellen gegeben und diese für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Auslesen der Renilla-Lumineszenz erfolgt mit dem „EnduRen™ Life cell substrate“ (Promega).

3.3 Biochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden unter reduzierenden Bedingungen durch diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (SDS) - Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Die Proteine werden dabei mit SDS komplexiert und dadurch negativ geladen. Die negativen SDS-Protein-Komplexe wandern in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Spannung in Richtung Anode und trennen sich entsprechend ihrer Molekülgröße auf. Dabei zeigen kleine Proteine ein schnelleres Laufverhalten im Gel als große. Das Gel besteht aus einem 4%igen Sammelgel und, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine, einem höherprozentigen Trenngel. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden, wird ihnen eine entsprechende Menge 4 x Proteinprobenpuffer zugesetzt. Neben den Proben wird ein Größenmarker aufgetragen, der die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine ermöglicht. Bei der analytischen SDS-PAGE werden mehrere Proben nebeneinander aufgetragen um sie zu vergleichen, während bei der präparativen SDS-PAGE nur eine Probe über die gesamte Breite der PAGE aufgetrennt wird. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer BioRad-Minigelkammer mit Proteingellaufpuffer bei 90-150 V.

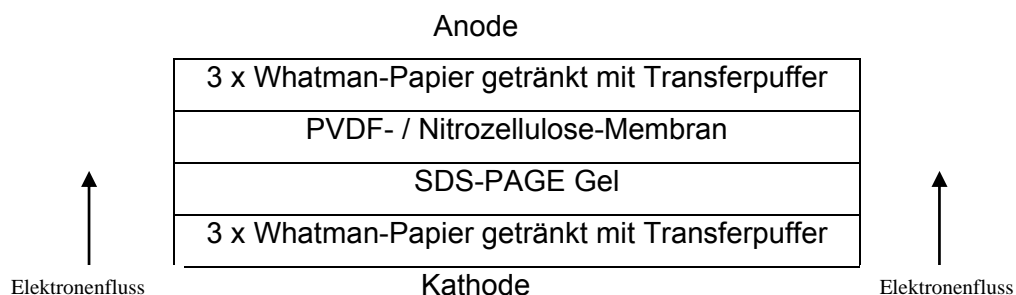
	Sammelgel:	Trenngel:
	4%	12%
dH ₂ O	3,4 ml	3,3 ml
30% Polyacrylamid-Lösung (rotiphorese® Gel 30)	830 µl	4,0 ml
PAGE-Sammelgelpuffer	680 µl	-
PAGE-Trenngelpuffer	-	2,6 ml
10% APS	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	4 µl

3.3.2 Coomassie®-Färbung

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit Coomassie® Brilliant Blue R250 direkt angefärbt werden. Dazu wurde das Gel 20 min bei RT in Coomassie®-Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert und anschließend in Fixierer/Entfärber-Lösung bis zum gewünschten Grad entfärbt, so dass nur die Proteinbanden sichtbar blieben.

3.3.3 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot stellt mit einer Nachweisgrenze von 1 pg Protein eine empfindliche Nachweismethode für Proteine dar. Dafür werden diese zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.3.1). Anschließend werden die Proteine in einer Elektroblo-Apparatur auf eine PVDF-Membran (bzw. bei Verwendung von fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpern auf eine Nitrozellulose-Membran) transferiert. Dabei findet eine irreversible Bindung der Proteine an die Membran statt. Hierdurch werden die Proteine immunologischen Nachweisreaktionen zugänglich. Die PVDF-Membran wird vor dem Transfer in 100% Methanol eingelegt und anschließend mit Transferpuffer äquilibriert. Die Nitrozellulose muss lediglich mit Transferpuffer benetzt werden und darf nicht in Methanol eingelegt werden. Alle weiteren Schritte unterscheiden sich jedoch bei Verwendung unterschiedlicher Membranen nicht. Jeweils 3 Blätter Whatman-Papier werden mit Transferpuffer getränkt. Gemäß unten stehender Skizze wird der Blot aufgebaut.



Der Elektrotransfer der Proteine wird für 35 min bei einer Stromstärke von 20 V durchgeführt.

3.3.4 Antikörperfärbung von Western Blots

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die PVDF- oder alternativ die Nitrocellulose-Membran nach dem Proteintransfer entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei RT auf dem Schüttler in 10% Milchpulver in PBS_{def.} inkubiert. Daran schließt sich nach kurzem Waschen der Membran in PBS_{def.} / 0,1% Tween 20 eine einstündige Inkubation mit einer Verdünnung des proteinspezifischen Erstantikörpers bei RT auf dem Schüttler an. Das verwendete Volumen muss ausreichen, um die Blotmembran vollständig zu bedecken.

Der Inkubation mit dem Erstantikörper folgen drei 5-minütige Waschschriffe in PBS_{def.} / 0,1% Tween 20. Im nächsten Schritt wird die Membran für 1 h mit einem Peroxidase (POD)-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert und anschließend zweimal 5 min mit PBS_{def.} / 0,1% Tween 20 und einmal 10 min mit PBS_{def.} auf dem Schüttler gewaschen. Statt des Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers können auch Fluorophor-gekoppelte Antikörper verwendet werden. Hierbei beträgt die Inkubationszeit nur 45 min und muss lichtgeschützt erfolgen. Die folgenden Waschschriffe gleichen denen bei POD-gekoppelten Antikörpern, nur dass auch hier eine lichtundurchlässige Box verwendet wird.

Alle Verdünnungen werden in PBS_{def.}/ 1% Milchpulver/ 0,1% Tween 20 vorgenommen.

Anti-GP [50-6-10], monoklonal (Maus)	1:50
Anti-GP, polyklonal (Kaninchen)	1 :100
Anti-VP40 [40-2-2], monoklonal (Maus)	1:500
Anti-VP40 konz. , monoklonal (Maus)	1:1000
Anti-NP [59], monoklonal (Maus)	1 :500
Anti-NP konz. , monoklonal (Maus)	1 :1000
Anti-VP30 [11-6], monoklonal (Maus)	1 :200
Anti-VP35 [2], polyklonal (Meerschweinchen)	1 :5000
Anti-VP24 [anti-GST], polyklonal (Kaninchen)	1:10
Anti-MARV Serum [37-5], (Ziege)	1:3000
Anti-Tubulin, monoklonal (Maus)	1:20000

Anti-Maus, POD-gekoppelt (Ziege)	1:40000
Anti-Kaninchen, POD-gekoppelt (Ziege)	1:20000
Anti-Meerschweinchen, POD-gekoppelt (Ziege)	1:20000
AlexaFluor [®] 680 Ziege anti-Maus IgG	1:5000
AlexaFluor [®] 680 Ziege anti-Kaninchen IgG	1:5000
IRDye [™] 800 Ziege anti-Maus IgG	1:5000
IRDye [™] 800 Ziege anti-Meerschweinchen IgG	1:5000

3.3.5 Chemolumineszenztest

Die Detektion des POD-gekoppelten Zweitantikörpers erfolgt durch Chemolumineszenz. Dazu wird die Membran auf Folie gelegt, pro Blot 500 µl SuperSignal[®], bei sehr schwachen Signalen 500 µl FemtoSignal[®], mit 500 µl Luminol / Enhancer-Lösung gemischt, auf der Membran verteilt und diese mit einer zweiten Folie bedeckt. Überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen werden nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT entfernt und die Membran zwischen den Folien eingeschweißt. In der Dunkelkammer wird diese für wenige Sekunden bis zu 30 min je nach Signalstärke auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Entwicklung des Films findet mithilfe des Entwicklers Optimax 2010 statt.

3.3.6 Entfernung von gebundenen Antikörpern von bereits analysierten PVDF-Membranen

Sollen PVDF-Membranen ein zweites Mal mit einem anderen Antikörper inkubiert werden, müssen die bereits zuvor gebundenen Antikörper der ersten Inkubation entfernt werden, wodurch jedoch auch ein Teil des Proteins auf der Membran verloren geht.

10 ml des *Stripping*-Puffers werden frisch mit 68,2 µl β-Mercaptoethanol versetzt und die PVDF-Membran darin für 30 - 45 min bei 50 °C im Wasserbad geschwenkt. Anschließend wird die Membran zweimal 5 min im Waschpuffer für Western Blot gewaschen. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen mit Blockierungspuffer für 1 h ist die PVDF-Membran dann zur erneuten Färbung bereit.

3.3.7 Detektion von Western Blots mit Fluorophor-markierten Antikörpern

Hierbei erfolgt die Detektion des sekundären Antikörpers über Fluoreszenzsignale im infraroten Bereich. Die feuchte Membran wird hierzu auf die Glasplatte des LiCor Gerätes gelegt und mit einer Gummimatte luftblasenfrei abgedeckt, was ein Austrocknen der Membran verhindert. Das Absorptionsmaximum der Farbstoffe mit denen die sekundären Antikörper markiert werden, liegt bei 680 oder 780 nm. Im Inneren des Gerätes befinden sich zwei unabhängige Laser, deren Wellenlänge diesem Absorptionsmaximum entspricht, so dass die Emission von zwei separaten Detektoren gemessen werden kann. Dies erlaubt die simultane und unabhängige Detektion von zwei unterschiedlich markierten, sekundären Antikörpern auf der gleichen Membran. Die Auswertung erfolgt über die Odyssey-Software.

3.3.8 Luziferaseassay

Das Luciferase[®] Reporter Assay System und das Renilla Luciferase Assay System (Promega) erlauben die Detektion von Firefly- (*Photinus pyralis*) und Renilla- (*Renilla reniformis*) Luziferase. Während die Firefly-Luziferase die Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin katalysiert, führt die Umsetzung von Coelenterazin durch die Renilla-Luziferase zur Bildung von Coelenteramid. Bei beiden Reaktionen kommt es dabei zur Biolumineszenz, die mit Hilfe eines Luminometers detektiert werden kann. Hierzu wird das in 3.2.4 gewonnene Lysat 1:100 mit 1x Reporter Lysis buffer bzw. Passive Lysis buffer (Promega) verdünnt und 10 µl in eine 96-Loch-Luminometerplatte gegeben. Zur Messung der Proben wird das Luminometer Cento LB 960 verwendet, welches durch Zufügen von 50 µl des Substrates der Firefly- bzw. Renilla-Luziferase pro Loch der Platte die Reaktion startet und nach einer Inkubationszeit von 1 s die Lumineszenz für 5 s detektiert und quantifiziert.

Die Messungen mit dem „EnduRen[™] Life cell substrate“ (Promega) erfolgt im Unterschied dazu in lebenden HUH7-Zellen, die in einer speziell beschichteten Luminometer-Platte kultiviert werden. Das in DMSO gelöste Substrat wird 1:1000 in DMEM (5% FCS) verdünnt (Endkonzentration 60 µM) und davon pro Loch 100 µl pipettiert. Die Zellen werden dann für mindestens 1,5 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wird das Substrat von den Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre Esterasen

gespalten, so dass Celenterazine-H entsteht, ein Substrat, welches von der Renilla-Luziferase zur Bildung von Coelenteramide-H verwendet wird, wobei wiederum Lumineszenz entsteht. Das Lumineszenzsignal ist für 24 h stabil und wird mit dem Cento LB 960 detektiert, wobei jedes Loch der Platte 4-mal für 5 s gemessen wird (mit einer Pause von 3 min) was eine statistische Auswertung der Reporterogenaktivität erlaubt.

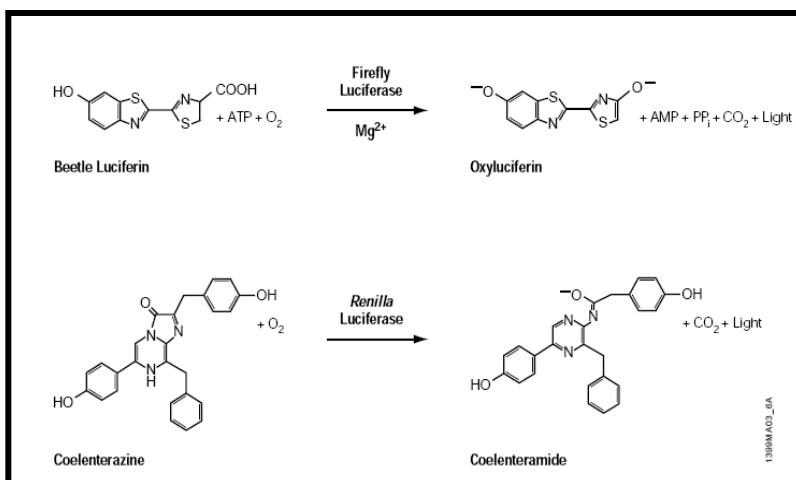


Abb. 3.3 Übersicht der Renilla und Firefly-Luziferase Reaktion. Die Firefly-Luziferase (aus *Photinus pyralis*) katalysiert die Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin, während die Renilla Luziferase (aus *Renilla reniformis*) Coelenterazin zu Coelenteramid umsetzt. Bei beiden Reaktionen kommt es zur Freisetzung von Licht in Form von Biolumineszenz.

3.3.9 CAT-Reporterassay

Die Quantifizierung der Reporterogenaktivität erfolgt über die Aktivitätsbestimmung der auf dem Minigenom kodierten Chloramphenicol Acetyl-Transferase (CAT). Die CAT katalysiert die Übertragung von Acetyl-Gruppen des Donors Acetyl-Coenzym A auf den Akzeptor [^{14}C]-Chloramphenicol wobei die Produkte 1'-Acetylchloramphenicol, 3'-Acetylchloramphenicol und 1',3'-Acetylchloramphenicol entstehen, die in ihrem Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie (DC) unterschieden werden können.

Ansatz:

0,2 – 4 µl	Zelllysat aus 293-Zellen
150 µl	250 mM Tris/HCl (pH 7,5)
1 µl	Acetyl-Coenzym A (70 mg/ml)
2 µl	[¹⁴ C]-Chloramphenicol (25 µCi/ml)

Die Reaktion wird für 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 750 µl Ethylacetat gestoppt. Nach kräftigem Mischen und einer zweiminütigen Zentrifugation bei 10.000 UpM wird die obere organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Vakuumverdampfer vollständig eingedampft. Das dabei entstehende Pellet wird in 10 µl Ethylacetat aufgenommen und auf eine mit Kieselgel beschichtete DC-Platte aufgetropft. Die Platte wird in eine abgeschlossene Kammer in DC-Laufpuffer gestellt bis die Laufront den oberen Rand erreicht. Die Auswertung erfolgt über die Exposition der DC-Platte mit einer Bio-Imagingplatte sowie dem Bio-Imager Analyzer (3.3.10).

3.3.10 Autoradiographie

Die mittels Dünnschichtchromatographie (3.3.9) aufgetrennten radioaktiv markierten Mono- und Diacetylchloramphenicole werden mit dem Bio-Imager Analyzer BAS-1000 visualisiert. Die radioaktive Strahlung versetzt Elektronen in der Bio-Imagingplatte in einen angeregten Zustand. Beim Einlesen im Bio-Imager Analyzer wird die Platte mit einem Helium-Neon-Laser abgetastet, wodurch die bereits angeregten Elektronen zusätzlich angeregt werden und dann unter Emission von Licht in ihren ursprünglichen Energiezustand zurückfallen. Die Daten werden digitalisiert und am Computer mithilfe der Software TINA2.0 ausgewertet.

3.3.11 Proteinase K-Behandlung

Die Serinprotease Proteinase K spaltet Peptidbindungen von aliphatischen, aromatischen und hydrophoben Aminosäuren, die zugänglich und nicht durch eine Membraninsertion oder –anlagerung vor einem Abbau geschützt sind.

Nach der Aufreinigung der iVLPs durch Ultrazentrifugation werden die Partikel in einem entsprechenden Volumen PBS_{def} aufgenommen. Je 20 µl des Ansatzes werden für den Proteinase K-Verdau verwendet und mit 2 µl Proteinase K (1,5 µg/µl) für 35 min bei

37°C inkubiert. Als Kontrollen werden in einem Ansatz kein Enzym zugefügt und in einem anderen zusätzlich 1% Triton X-100. Während bei dem Ansatz mit Proteinase K ausschließlich freie bzw. zugängliche Proteindomänen angreifbar sind, sorgt die Anwesenheit von Triton X-100 für eine Zerstörung der Lipidmembran der iVLPs, was den vollständigen Abbau aller Proteine innerhalb der Partikel zur Folge hat.

Die Proteinase K wird anschließend durch 1 µl PMSF (100 mM) und 5-minütige Inkubation bei RT inaktiviert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.3.1).

3.3.12 Präparation von iVLPs und Zellen für elektronenmikroskopische Studien (Negativkontrastierung)

Für eine Negativkontrastierung der Proben werden die iVLPs im Verhältnis 1:1 in DMEM (-)/ 4% PFA fixiert. Um transfizierte oder infizierte Zellen zu betrachten, werden diese 30 min mit DMEM (-)/ 4% PFA/ 2,5% Glutaraldehyd fixiert und anschließend mit einem Zellschaber vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt von 13000 Upm wird der Überstand entfernt und durch DMEM (-)/ 4% PFA ersetzt.

Durch einen Zentrifugationsschritt in einer Vakuum-Zentrifuge bei 100.000 g gelangen die Partikel oder Zellen auf ein Gitterplättchen (Grid). Die Behandlung mit 2 % Phosphorwolframsäure macht die Partikel mittels Elektronenmikroskopie sichtbar.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines infektiösen Minigenomsystems für Marburg Virus basierend auf Virus-ähnlichen Partikeln (iVLPs)

Zu Beginn dieser Arbeit lag ein Marburg Virus (MARV)-spezifisches Minigenomsystem vor, mit welchem es möglich war, die Rolle der Nukleokapsidproteine während der viralen Replikation und Transkription unter normalen Laborbedingungen (BSL-1) zu untersuchen (Muhlberger et al., 1998). In diesem System wird das Minigenom von den viralen Nukleokapsidproteinen repliziert und gleichzeitig zu Mininukleokapsiden verpackt. Es sollte nun versucht werden, durch die Expression der viralen Proteine VP24, VP40 und GP die Umhüllung der Mininukleokapside an der Plasmamembran zu initiieren. Diese Partikel sollten dann aus der Zelle ausgeschleust werden und als infektiöse Virus-ähnliche Partikel (iVLPs) im Zellüberstand vorliegen. Um die Infektiösität der iVLPs zu testen, sollten neue Zielzellen mit dem Zellüberstand inkubiert werden, deren Infektion sich anhand der Reportergenaktivität des transkribierten Minigenoms nachweisen lassen sollte (Abb. 1.3). Ein ähnliches System wurde für das Ebola Virus (EBOV) beschrieben (Watanabe et al., 2004).

Die Expression der viralen Proteine sollte unter Kontrolle des Polymerase II-Promotors erfolgen, während das Minigenom unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert werden sollte. Durch Verwendung des Reportergens Luziferase sollte eine schnelle, sensitive und standardisierbare Quantifizierung der Transkriptions- und Replikationsaktivität des viralen Nukleokapsidkomplexes in den Zielzellen ermöglicht werden.

4.1.1 Umstellung des Marburg Virus Minigenomsystems auf eukaryotische Promotoren

Zunächst wurden die Expression und Funktionalität der von vorhandenen pCAGGS-Plasmiden kodierten MARV-Proteine überprüft. Hierzu wurden 293-

Zellen mit den Plasmiden pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30, die für die viralen Nukleokapsidproteine kodieren, und dem von Mühlberger et al. etablierten 3M-5M CAT-Minigenom zusammen mit einem Plasmid transfiziert, welches die T7-Polymerase exprimiert (pCAGGS-T7). Wenn die exprimierten Proteine aktiv sind, wurde erwartet, dass Reporterogenaktivität detektierbar ist. Als Kontrolle wurde das originale MARV-spezifische Minigenomsystem (Abb. 4.1 A Spur 2) und das für Ebola Virus (EBOV) beschriebene iVLP-System (Abb. 4.1 A Spur 3) mitgeführt (Watanabe, 2004).

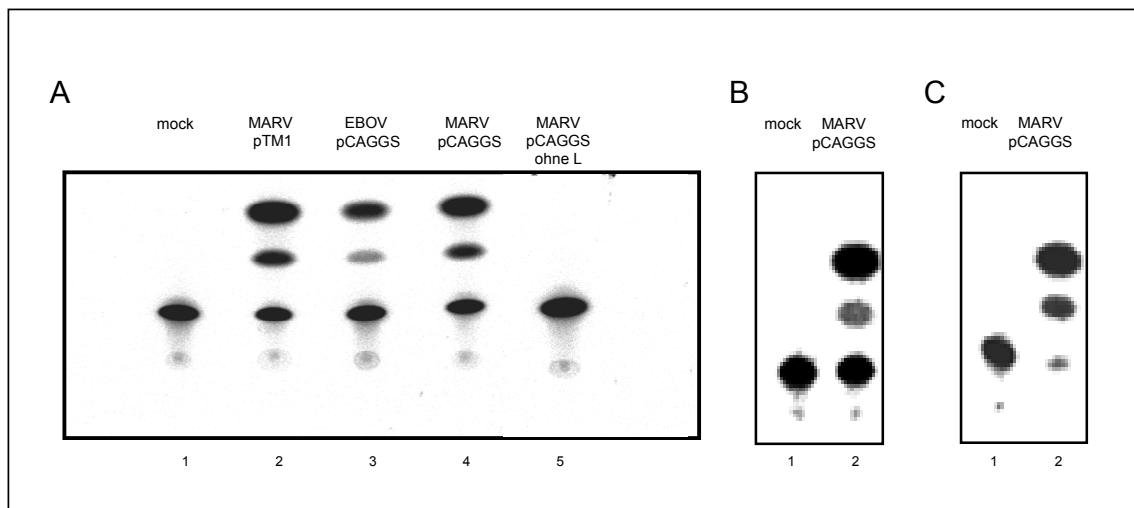


Abb. 4.1: Überprüfung der Expression und Funktionalität der MARV-Expressionsplasmide.

(A) 293-Zellen wurden mit den MARV-Expressionsplasmiden pCAGGS-L, -NP, -VP35, -VP30, -T7 und dem Minigenom 3M-5M CAT transfiziert, für 65 h inkubiert und anschließend ein CAT-Reporterassay durchgeführt (A, Spur 4). Als Kontrolle wurde das MARV-spezifische Minigenomsystem von Mühlberger et al. (A, Spur 2) und das für Ebola Virus (EBOV) beschriebene iVLP-System (A Spur 3) mitgeführt (Mühlberger et al., 1998; Watanabe et al., 2004). Zudem dienten als Negativkontrollen nicht transfizierte Zellen (A, Spur 1) und Zellen, bei denen alle MARV pCAGGS-Expressionsplasmide außer pCAGGS-L transfiziert wurden (A, Spur 5). (B) 293-Zellen wurden mit allen sieben MARV pCAGGS-Expressionsplasmiden (pCAGGS-L, -NP, -VP35, -VP30, -VP24, -VP40, -GP), pCAGGS-T7 und dem Minigenom 3M-5M CAT transfiziert und die CAT-Reporteraktivität nach einer 65-stündigen Inkubation im Lysat der Zellen bestimmt. (C) Die in den Zellkulturüberstand abgegebenen iVLPs wurden durch Ultrazentrifugation gereinigt und zur Infektion von mit pCAGGS-L, pCAGGS-NP, pCAGGS-VP35 und pCAGGS-VP30 transfizierten HUH7-Zellen verwendet. Nach 65 h erfolgte die Zellyse und Detektion der CAT-Reporteraktivität.

Die Zellen wurden für 65 h inkubiert, im Anschluss lysiert und ein Chloramphenicol Acetyl-Transferase (CAT)-Assay durchgeführt (3.2.3, 3.3.9). Anhand der gemessenen CAT-Aktivität zeigte sich, dass die unter Kontrolle des Polymerase II-Promotors stehenden MARV Gene exprimiert wurden und

funktionell waren. Bei Mengen von 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35 und 0,1 µg pCAGGS-VP30 wurde ein starkes Reportergensignal gemessen, was darauf schließen lässt, dass MARV-spezifische Transkription stattgefunden hat (Abb. 4.1 A Spur 4). Als Negativkontrollen wurden nicht transfizierte Zellen (Abb. 4.1 A Spur 1) und Zellen, bei denen alle pCAGGS-Expressionsplasmide außer pCAGGS-L transfiziert wurden, verwendet (Abb. 4.1 A Spur 5). Hier zeigte sich kein Reportergensignal.

4.1.2 Ausschleusung von iVLPs und Infektion von Zellen in Gegenwart von VP24, VP40 und GP

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Aktivität der viralen Nukleokapsidproteine sollte durch zusätzliche Transfektion von pCAGGS-VP24, pCAGGS-VP40 und pCAGGS-GP und der daraus folgenden Expression der entsprechenden viralen Proteine das enkapsidierte Minigenom spezifisch in iVLPs verpackt und aus der Zelle ausgeschleust werden. Durch den Einbau des Oberflächenproteins GP in iVLP-Membranen sollten die freigesetzten iVLPs in der Lage sein, Rezeptorspezifisch an Wirtszellen zu binden und nach Rezeptorvermittelter Endozytose die Fusion von Virus- und Wirtsmembran zu vermitteln (Sanchez, 2007). Das Minigenom sollte so in die neuen Wirtszellen eingebracht werden, die zuvor mit den für die Nukleokapsidproteine kodierenden Plasmiden (pCAGGS-L, -NP, -VP35, -VP30) transfiziert worden waren. Das eingebrachte Minigenom steht damit als Matrize für den Replikations- und Transkriptionskomplex zur Verfügung. Die Transkription des Minigenoms führt zur Synthese der CAT mRNA, die von der Zelle translatiert wird. Die Aktivität der CAT in den neuen Zielzellen ist somit ein Hinweis auf die erfolgreiche Verpackung und Ausschleusung des Minigenoms aus den Zellen der Passage 0 und die Infektiosität der iVLPs für Passage 1-Zellen.

293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden, die für alle MARV-spezifischen Proteine kodieren sowie pCAGGS-T7 und 3M-5M CAT transfiziert und die ausgeschleusten iVLPs durch Ultrazentrifugation konzentriert (3.2.7). Als

Zielzellen wurden HUH7-Zellen verwendet, die mit den ankonzentrierten iVLPs infiziert wurden. Für das verwandte EBOV System konnte bereits gezeigt werden, dass eine Transfektion der Zielzellen mit EBOV-spezifischen Plasmiden pCAGGS-L, pCAGGS-NP, pCAGGS-VP35 und pCAGGS-VP30 eine Erhöhung der Reportergenaktivität in infizierten Zellen zur Folge hat (Watanabe et al., 2004). Die viralen Nukleokapsidproteine bilden den viralen Polymerasekomplex und lesen das eingedrungene Minigenom ab. Damit wird die Transkriptionsaktivität des mit dem Nukleokapsid assoziierten Polymerasekomplexes erhöht. Ferner ermöglicht die Anwesenheit großer Mengen an Nukleoprotein auch die virale Replikation und führt damit zur Bereitstellung weiterer Kopien des Minigenoms, die wiederum die Transkriptionsaktivität des Systems erhöhen.

HUH7-Zellen wurden 16h vor der Infektion durch iVLPs mit Nukleokapsidprotein-exprimierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und ein CAT-Assay durchgeführt (3.2.3, 3.3.9).

Wie an dem CAT-Reportersignal in Abb. 4.1 B zu sehen, wurde das Minigenom in den transfizierten 293-Zellen (P0-Passage) transkribiert. Die erfolgreiche Verpackung, Ausschleusung der VLPs und die Infektion neuer Zellen wurde durch das CAT-Reportersignal in den infizierten HUH7-Zellen (P1-Passage) nachgewiesen (Abb. 4.1 C).

4.1.3 Umstellung des Marburg Virus-spezifischen Minigenomsystems auf das Renilla Luziferase Reportergen

Filovirale Minigenome setzen sich aus einem Reportergen und den 3'-Leader und 5'-Trailer RNA-Sequenzen des viralen Genoms zusammen (1.6). Im 5'-Bereich des Minigenoms befindet sich ein T7-Promotor und im 3'-Bereich eine Sequenz, die für das Hepatitis Delta Ribozym kodiert (Abb. 4.2).

Da die Auswertung der CAT-Aktivität des verwendeten 3M-5M CAT Minigenoms äußerst zeitaufwendig ist und die Quantifizierung nicht sensitiv genug erschien, sollte ein geeigneteres Reportergen verwendet werden.

Es wurde das weit verbreitete Renilla Luziferase Reportergen ausgewählt, welches aus der Seequalle (*Renilla reniformes*) stammt und ein Enzym kodiert, das bei Zugabe des Substrates Coelenterazin blaues Licht mit einer Wellenlänge von 482 nm emittiert (Matthews et al., 1977).

Da der 3M-5M CAT Vektor keine geeigneten Restriktionsschnittstellen aufwies, wurde die Leader Region des 3M-5M CAT und das Renilla Luziferase Reportergen eines EBOV Minigenoms (3E-5E luc) mittels PCR amplifiziert und mittels rekombinanter PCR fusioniert (3.1.14) (Muhlberger et al., 1999). Die Primer für die PCR-Reaktion wurden so synthetisiert, dass sie eine RsrII-Schnittstelle im 5'-Bereich und eine NotI-Schnittstelle im 3'-Bereich enthielten. Das PCR-Produkt und das Plasmid 3M-5M CAT wurden mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten und das Renilla Luziferase-Gen in den Vektor ligiert, aus welchem das CAT-Gen entfernt worden war (3.1.4 - 3.1.7). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Sequenzierung überprüft (3.1.16).

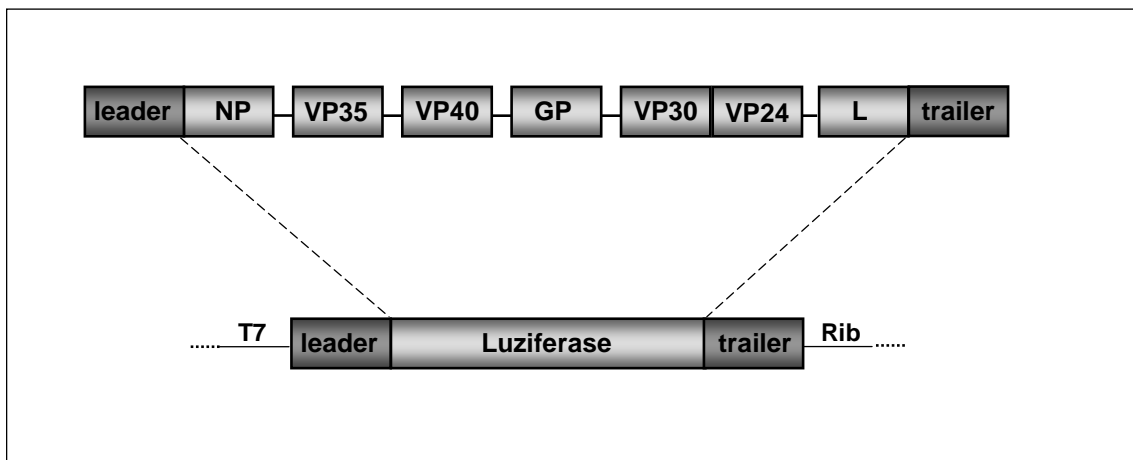


Abb. 4.2: Genomaufbau des Marburg Virus und des Minigenoms 3M-5M luc. Ausgehend von der 3'-Leader-Region werden im MARV-Genom die Gene NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 und L kodiert, gefolgt von der 5'-Trailer-Region. In den Bereichen zwischen den Genen befinden sich nicht transkribierte intergenische Sequenzen, die zwischen VP30 und VP24 überlappen. Filovirale Minigenome setzen sich aus einem Reportergen (hier Luziferase) und den flankierenden 3'-Leader und 5'-Trailer RNA-Sequenzen des viralen Genoms zusammen. Im 5'-Bereich des Minigenoms befindet sich ein T7-Promotor und im 3'-Bereich eine Sequenz, die für das Hepatitis Delta Ribozym (Rib) kodiert.

4.2 Einfluss verschiedener Mengen der Marburg Virus Expressionsplasmide auf virale Transkription, Partikelbildung und Infektion

Es konnte bereits von Mühlberger et al. gezeigt werden, dass die Reporterogenaktivität des Minigenomsystems abhängig von der Menge der Plasmide ist, welche für die viralen Nukleokapsidproteine kodieren (Mühlberger et al., 1998).

Im Folgenden wurde nun mit dem neu etablierten iVLP-System untersucht, wie sich unterschiedliche Verhältnisse der viralen Proteine zueinander auf die Transkription/Replikation, die Ausschleusung und die Infektiosität der gebildeten iVLPs auswirken.

Hierzu wurden Titrationsversuche durchgeführt, bei denen die Menge jeweils eines Expressionsplasmides bei der Transfektion erhöht, während die Menge der anderen konstant gehalten wurde.

4.2.1 Titrationsanalyse des Nukleoproteins NP

Das Nukleoprotein NP ist im Virion mengenmäßig am stärksten vertreten und enkapsidiert die virale RNA (Becker et al., 1994; Sanchez et al., 1992). Um die Auswirkungen unterschiedlicher NP-Plasmidmengen auf das iVLP-System zu untersuchen, wurden die Konzentrationen aller Plasmide konstant gehalten und nur die des pCAGGS-NP variiert. Es wurden 0,01 µg, 0,05 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,5 µg oder 1 µg pCAGGS-NP zusammen mit den anderen Komponenten des iVLP Systems transfiziert. Die Zellen der Passage 0 wurden lysiert und mittels Western Blot analysiert. Es zeigte sich eine Zunahme von NP in Abhängigkeit von der transfizierten Plasmidmenge (Abb. 4.3 A). Bereits ab einer Menge von 0,05 µg pCAGGS-NP (Spur 2) war NP im Lysat nachweisbar.

Um die verwendeten Zellmengen der Ansätze zu vergleichen und einen möglichen Einfluss der exprimierten Proteine auf die zelluläre Transkription abzuschätzen, wurde die Expression von Tubulin untersucht, ein in allen Eukaryonten vorkommender Bestandteil von Mikrotubuli. Bei den hier

untersuchten Ansätzen zeigten sich keine Unterschiede im Expressionsniveau des Tubulins (Abb. 4.3 A Spur 1-6).

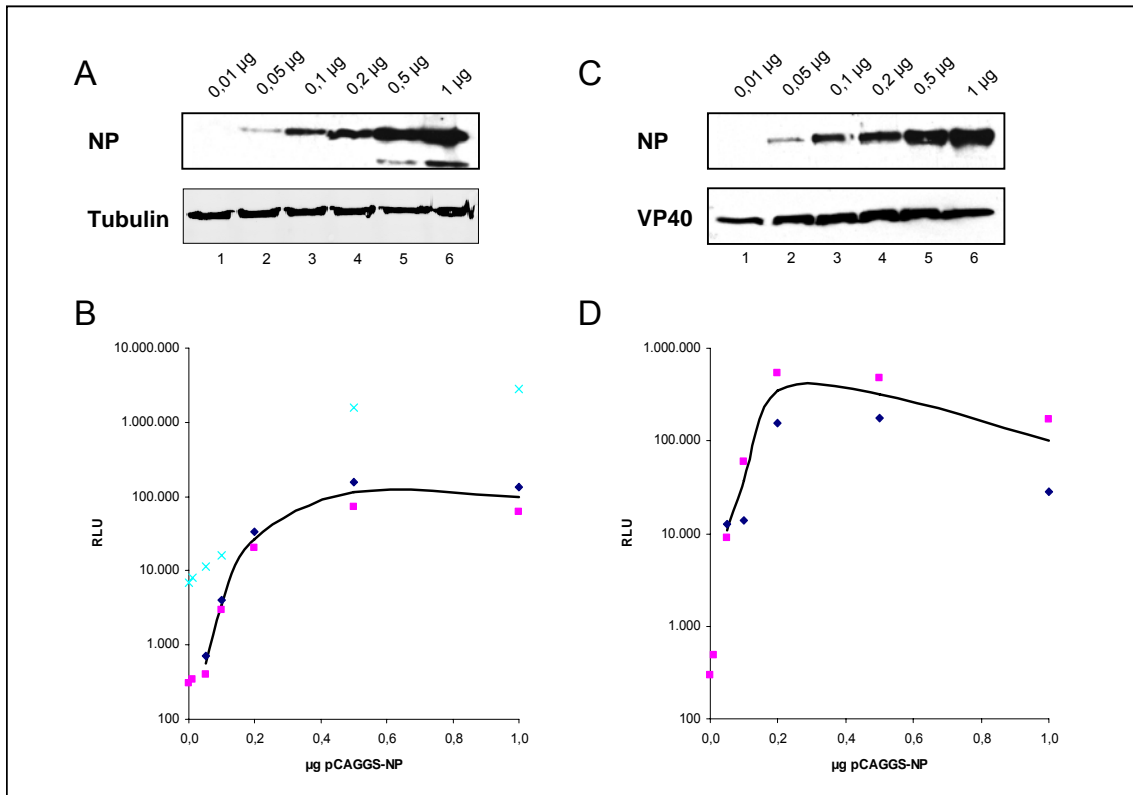


Abb. 4.3: Einfluss des Nukleoproteins NP auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.

(A) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40, 0,5 µg pCAGGS-GP und verschiedenen Mengen von pCAGGS-NP (0,01 µg; 0,05 µg; 0,1 µg; 0,2 µg; 0,5 µg; 1 µg) transfiziert und für 65 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Zur Antikörperfärbung der Blotmembranen wurden ein monoklonaler Maus anti-NP und ein Maus anti-Tubulin Antikörper verwendet, welche mit einem POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Zweitantikörper detektiert werden konnten. (B) Das Lysat wurde ferner zur Bestimmung der Reporterogenaktivität genutzt, indem die Renilla-Aktivität gemessen und mit der eingesetzten Menge an NP-Plasmid korreliert wurde. (C) Der die iVLPs enthaltende Überstand wurde ultrazentrifugiert, die gereinigten iVLPs einem Proteinase K-Verdau unterzogen und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einem monoklonalen Maus anti-NP und anti-VP40 Antikörper gefärbt und diese durch einen sekundären POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. (D) HUH7-Zellen, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert. Nach Inkubation der Zellen für 65 h wurden diese lysiert und für einen zweiten Reportergenassay verwendet.

Wie in Abb. 4.3 B zu erkennen, war mit zunehmender Menge an NP eine Erhöhung der Reportergenaktivität in den Zellen der P0-Passage zu verzeichnen. Die maximale Aktivität wurde bei Transfektion von 0,5 µg pCAGGS-

NP erreicht; weitere Erhöhungen der Plasmidmengen führten nicht zu einer gesteigerten Reporterogenaktivität. Allerdings wurde die Reporterogenaktivität von höheren Konzentrationen an NP auch nicht wesentlich inhibiert. Mittels Western Blot Analyse wurden die in den Überstand abgegebenen iVLPs untersucht (3.3.3 - 3.3.5). Es war eine stetige Zunahme von NP in den iVLPs zu erkennen, während die Menge anderer viraler Proteine, hier am Beispiel von VP40 gezeigt, weitestgehend konstant blieb (Abb. 4.3 C). Allerdings lässt sich im Vergleich zu iVLPs, die ohne NP ausgeschleust werden, ein positiver Effekt des NP auf die iVLP-Freisetzung verzeichnen (Abb. 4.3 C Spuren 1 und 2). Generell weist der konzentrationsabhängige Einbau von NP darauf hin, dass bei gleicher Anzahl ausgeschleuster iVLPs die absolute Menge von NP pro iVLP zunimmt. In infizierten Zellen der P1-Passage nahm die Reporterogenaktivität in Abhängigkeit von der in Zellen der P0-Passage transfizierten NP-Plasmidmenge zunächst zu. Jedoch führten iVLPs aus Zellen, welche mit mehr als 0,2 µg pCAGGS-NP transfiziert wurden zu einer leicht abnehmenden Reporterogenaktivität in Zellen der P1-Passage (Abb. 4.3 D).

Zusammenfassend führt die Zunahme von NP in der Zelle einerseits zu einer Steigerung der Reporterogenaktivität bis zum Erreichen eines Plateaus und andererseits zu einem erhöhten Einbau des Proteins in iVLPs. Die Infektiösität der freigesetzten iVLPs erreicht in Abhängigkeit von der Menge an eingebautem NP ein Optimum bei etwa 0,2 µg pCAGGS-NP in P0. Interessanterweise scheinen größere Mengen NP in den Zellen der P0-Passage die Transkriptionsaktivität des Minigenomsystems nicht zu stören, während der vermehrte Einbau von NP in iVLPs die Infektiösität oder die Nukleokapsidfunktion inhibiert.

4.2.2 Titrationsanalyse der Polymerase L

Das L Protein der Filoviren fungiert als die katalytische Untereinheit der viralen Polymerase (Muhlberger et al., 1998; Muhlberger et al., 1992). Um die Auswirkungen unterschiedlicher L-Plasmidmengen auf das iVLP-System zu

untersuchen, wurden die Konzentrationen aller Plasmide konstant gehalten und nur die des pCAGGS-L variiert. Es wurden 0,01 μg , 0,05 μg , 0,1 μg , 0,2 μg , 0,5 μg und 1 μg pCAGGS-L zusammen mit den anderen Komponenten des iVLP-Systems transfiziert.

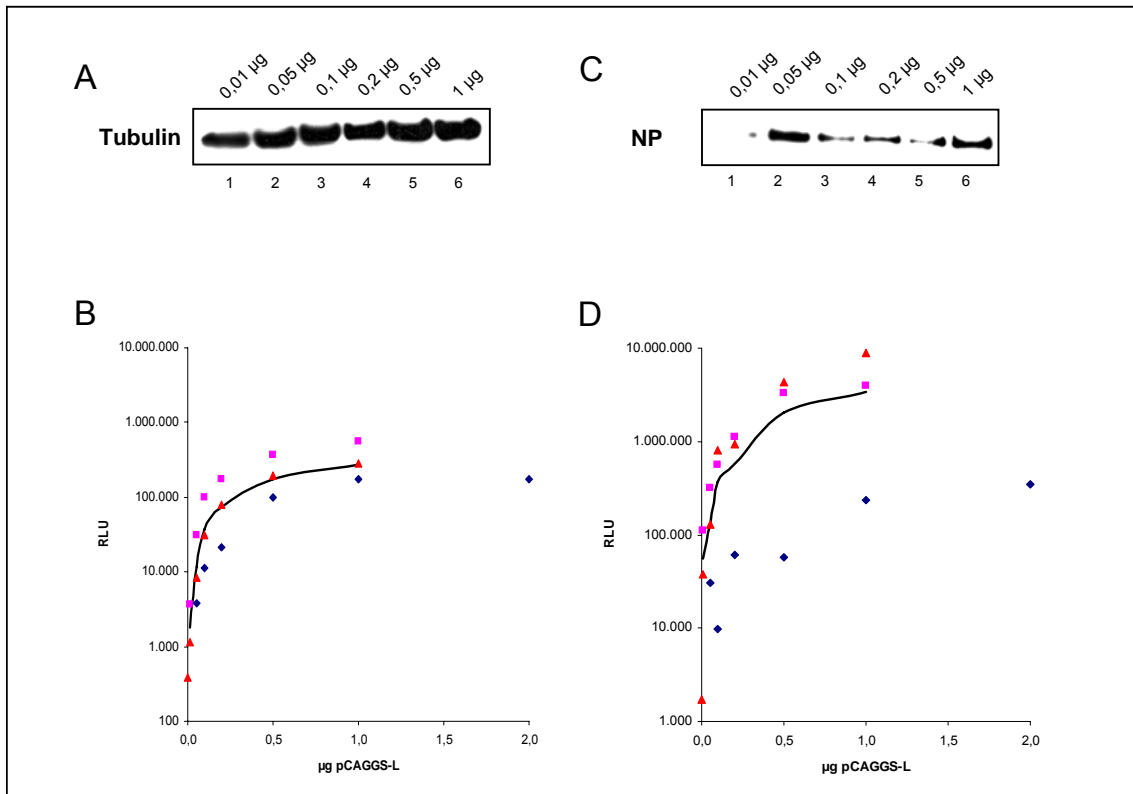


Abb. 4.4: Einfluss der Polymerase L auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.

(A) 293-Zellen wurden mit 1 μg 3M-5M luc, 0,5 μg pCAGGS-T7, 0,5 μg pCAGGS-NP, 0,1 μg pCAGGS-VP35, 0,1 μg pCAGGS-VP30, 0,07 μg pCAGGS-VP24, 0,5 μg pCAGGS-VP40, 0,5 μg pCAGGS-GP und verschiedenen Mengen von pCAGGS-L (0,01 μg ; 0,05 μg ; 0,1 μg ; 0,2 μg ; 0,5 μg ; 1 μg) transfiziert und für 65 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Zur Antikörperfärbung der Blotmembranen wurden ein monoklonaler Maus anti-Tubulin Antikörper verwendet, welcher mit einem POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Zweitantikörper detektiert werden konnte. (B) Das Lysat wurde ferner zur Bestimmung der Reportergenaktivität genutzt, indem die Renilla-Aktivität gemessen und mit der eingesetzten Menge an L-Plasmid korreliert wurde. (C) Der die iVLPs enthaltende Überstand wurde ultrazentrifugiert, die gereinigten iVLPs einem Proteinase K-Verdau unterzogen und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einem monoklonalen Maus anti-NP Antikörper gefärbt und dieser durch einen sekundären POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. (D) HUH7-Zellen, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert. Nach Inkubation der Zellen für 65 h wurden diese lysiert und für einen zweiten Reportergenassay verwendet.

Die Zellen wurden lysiert und einer Western Blot Analyse unterzogen. Das Zelllysate zeigte gleiche Mengen an Tubulin in allen Ansätzen (Abb. 4.4 A). Ein spezifischer Antikörper gegen L stand leider nicht zur Verfügung, weshalb die Menge an exprimiertem L nicht bestimmt werden konnte. Die Reporterogenaktivität nahm bei Plasmidmengen bis 0,2 µg exponentiell zu. Transfizierte Mengen von über 0,2 µg pCAGGS-L führten nur noch zu einer geringfügigen Erhöhung der Reporterogenaktivität (Abb. 4.4 B). Wie in der Western Blot Analyse der iVLP zu erkennen, war die Menge ausgeschleuster VLPs nicht mit der transfizierten pCAGGS-L Menge korreliert (Abb. 4.4 C). In den infizierten Zellen der P1-Passage war eine Steigerung der Reporterogenaktivität in Abhängigkeit von der Menge an L-Plasmid in den Zellen der P0-Passage zu beobachten. Auch hier erreicht die Reporterogenaktivität nach einer exponentiellen Phase ein Plateau bei etwa 1 µg pCAGGS-L (Abb. 4.4 D). Interessanterweise ließ sich in der P1-Passage in Abwesenheit von L in der P0-Passage nur Hintergrundaktivität nachweisen, was vermuten lässt, dass die Replikation des Minigenoms durch die virale Polymerase und nicht durch die ebenfalls vorhandene T7-Polymerase entscheidend für die Verpackung des Minigenoms in die Nukleokapside ist (Abb. 4.4 D).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass eine Erhöhung der Menge des transfizierten L-Plasmids bis 0,2 µg die Aktivität des Minigenomsystems sehr stark steigert. Das L-Protein scheint die Bildung und Ausschleusung der Partikel nur schwach zu beeinflussen, spielt aber für die Reporterogenaktivität in der P1-Passage eine entscheidende Rolle.

4.2.3 Titrationsanalyse des Polymerasekofaktors VP35

VP35 dient der viralen Polymerase als essentieller Kofaktor und ist somit direkt an Transkriptions- und Replikationsprozessen beteiligt (Muhlberger et al., 1998). Um die Auswirkungen unterschiedlicher VP35-Plasmidmengen auf das iVLP-System zu untersuchen, wurden die Konzentrationen aller Plasmide konstant gehalten und nur die des pCAGGS-VP35 variiert. Es wurden 293-Zellen mit 0,01

μg , 0,05 μg , 0,1 μg , 0,2 μg , 0,5 μg und 1 μg pCAGGS-VP35 zusammen mit den anderen Komponenten des iVLP-Systems transfiziert. Die Zellen der P0-Passage wurden lysiert und mittels Western Blot analysiert.

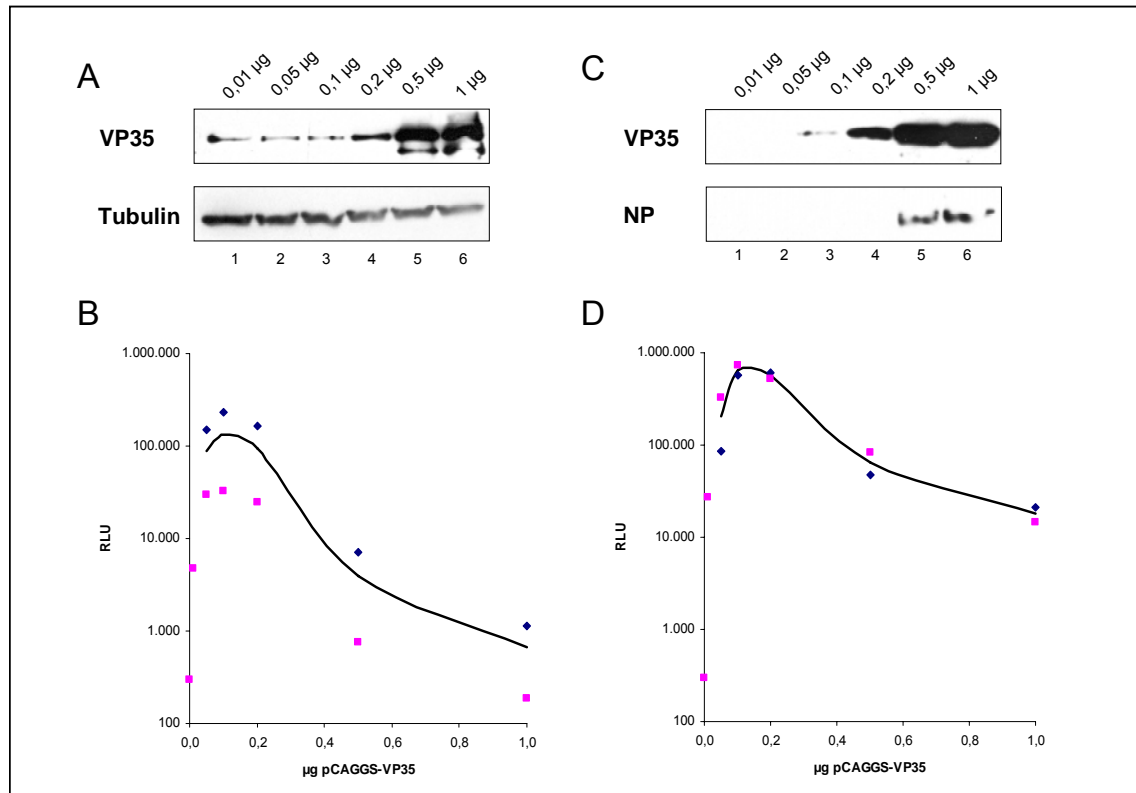


Abb. 4.5: Einfluss des Polymerasekofaktors VP35 auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.

(A) 293-Zellen wurden mit 1 μg 3M-5M luc, 0,5 μg pCAGGS-T7, 1 μg pCAGGS-L, 0,1 μg pCAGGS-NP, 0,1 μg pCAGGS-VP30, 0,07 μg pCAGGS-VP24, 0,5 μg pCAGGS-VP40, 0,5 μg pCAGGS-GP und verschiedenen Mengen von pCAGGS-VP35 (0,01 μg ; 0,05 μg ; 0,1 μg ; 0,2 μg ; 0,5 μg ; 1 μg) transfiziert und für 65 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Zur Antikörperfärbung der Blotmembranen wurden ein polyklonaler Meerschweinchen anti-VP35 und ein monoklonaler Maus anti-Tubulin Antikörper verwendet, welche mit einem POD-gekoppelten Kaninchen anti-Meerschweinchen und Ziege anti-Maus Zweitantikörper detektiert werden konnten. (B) Das Lysat wurde ferner zur Bestimmung der Reportergenaktivität genutzt, indem die Renilla-Aktivität gemessen und mit der eingesetzten Menge an VP35-Plasmid korreliert wurde. (C) Der die iVLPs enthaltende Überstand wurde ultrazentrifugiert, die gereinigten iVLPs einem Proteinase K-Verdau unterzogen und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einem polyklonalen Meerschweinchen anti-VP35 und einem monoklonalen Maus anti-VP40 Antikörper gefärbt und diese durch einen sekundären POD-gekoppelten Kaninchen anti-Meerschweinchen und Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. (D) HUH7-Zellen, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert. Nach Inkubation der Zellen für 65 h wurden diese lysiert und für einen zweiten Reportergenassay verwendet.

Es zeigte sich mit zunehmender VP35-Plasmidmenge eine Erhöhung der VP35-Konzentration auf Proteinebene. Die Expression des zur Kontrolle untersuchten Tubulins wurde bei hohen VP35-Konzentrationen leicht inhibiert (Abb. 4.5 A, Spuren 4 - 6). In Abb. 4.5 B ist zu erkennen, dass die Reportergenaktivität in Zellen der P0-Passage ein Maximum bei Transfektion von 0,1 µg pCAGGS-VP35 zeigte. Abweichungen von dieser optimalen Menge führten zu einem starken Rückgang der Reportergenaktivität.

Die Western Blot Analyse (Abb. 4.5 C) der in den Zellüberstand abgegebenen iVLPs zeigte eine Zunahme von eingebautem VP35 in Abhängigkeit von der transfizierten Plasmidmenge in den Zellen der P0-Passage. Hierbei war VP35 ab einer verwendeten Plasmidmenge von 0,1 µg (Spur 3) detektierbar und NP ab einer Menge von 0,5 µg pCAGGS-VP35 (Spuren 5 und 6). Die Messung der Reportergenaktivität der infizierten Zellen der P1-Passage ergab ein ähnliches Muster wie die der Zellen der P0-Passage. Abweichungen von 0,1 µg pCAGGS-VP35 bei der Transfektion führten zu einer deutlichen Verringerung der Reportergenaktivität auf unter 3% der maximal gemessenen Aktivität in den infizierten Zellen der P1-Passage (Abb. 4.5 D).

Es lässt sich festhalten, dass die Konzentration von VP35 in Zellen der P0-Passage offensichtlich sehr genau austariert sein muss, da jede Erhöhung der Plasmidkonzentration über 0,1 µg hinaus zur drastischen Inhibition der Reportergenaktivität und der Infektiösität der freigesetzten iVLPs führt.

4.2.4 Titrationsanalyse des Nukleokapsidproteins VP30

VP30 ist im verwandten EBOV ein essentieller Transkriptionsfaktor, während es im MARV Minigenomsystem für Replikation und Transkription nicht notwendig ist (John et al., 2007; Muhlberger et al., 1998). Sein Abschalten mittels RNA-Interferenz hat jedoch in MARV-infizierten Zellen eine Reduktion aller anderen Proteine zur Folge (Fowler et al., 2005). In einem auf cDNA basierenden MARV-spezifischen Rescue-System ist für die Bildung neuer Viren die Anwesenheit des

VP30 zwingend notwendig (Enterlein et al., 2006). Zur Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher VP30-Plasmidmengen auf das iVLP-System wurden die Konzentrationen aller Plasmide konstant gehalten

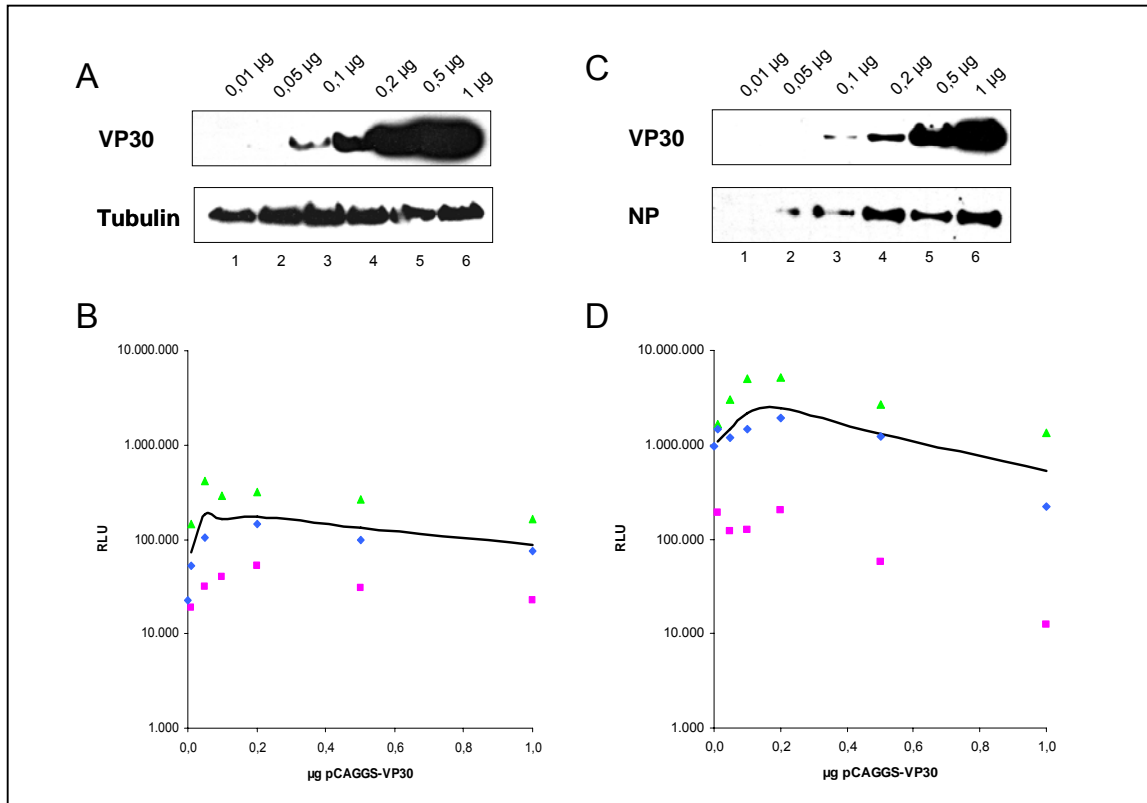


Abb. 4.6: Einfluss des Nukleokapsidproteins VP30 auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.

(A) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40, 0,5 µg pCAGGS-GP und verschiedenen Mengen von pCAGGS-VP30 (0,01 µg; 0,05 µg; 0,1 µg; 0,2 µg; 0,5 µg; 1 µg) transfiziert und für 65 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Zur Antikörperfärbung der Blotmembranen wurden ein monoklonaler Maus anti-VP30 und ein Maus anti-Tubulin Antikörper verwendet, welche mit einem POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Zweitantikörper detektiert werden konnten. (B) Das Lysat wurde ferner zur Bestimmung der Reporterogenaktivität genutzt, indem die Renilla-Aktivität gemessen und mit der eingesetzten Menge an VP30-Plasmid korreliert wurde. (C) Der die iVLPs enthaltende Überstand wurde ultrazentrifugiert, die gereinigten iVLPs einem Proteinase K-Verdau unterzogen und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einem monoklonalen Maus anti-VP30 und anti-NP Antikörper gefärbt und diese durch einen sekundären POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. (D) HUH7-Zellen, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert. Nach Inkubation der Zellen für 65 h wurden diese lysiert und für einen zweiten Reporterassay verwendet.

und nur die des pCAGGS-VP30 variiert. Es wurden 0,01 µg, 0,05 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,5 µg und 1 µg pCAGGS-VP30 zusammen mit den anderen Komponenten des iVLP-Systems transfiziert.

Die Zellen wurden lysiert und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Im Zelllysate konnte eine ansteigende VP30-Menge in Abhängigkeit von der transfizierten Plasmidmenge detektiert werden (Abb. 4.6 A). VP30 war ab einer Menge von 0,1 µg pCAGGS-VP30 im Lysat nachweisbar (Spuren 3 – 6). Die Reporterogenaktivität der Zellen der P0-Passage wurde um etwa das fünffache durch die Anwesenheit von VP30 gesteigert. Bei 0,1 – 0,2 µg pCAGGS-VP30 fand sich ein Aktivitätsmaximum (Abb. 4.6 B). Auch in Abwesenheit von VP30 konnte Reporterogenaktivität gemessen werden. Die Western Blot Analyse der in den Überstand abgegebenen iVLPs zeigte einen Anstieg von VP30 und NP bei zunehmender Plasmidmenge für VP30 (Abb. 4.6 C). VP30 war dabei ab einer Menge von 0,1 µg und NP ab einer Menge von 0,05 µg pCAGGS-VP30 nachweisbar (Spuren 3 und 2). Dies weist auf eine Steigerung der ausgeschleusten Partikelmenge in Anwesenheit von VP30 hin.

Abb. 4.6 D zeigt die Reporterogenaktivität in den infizierten Zellen der P1-Passage mit einem schwach ausgeprägten Maximum bei 0,1 – 0,2 µg VP30-Plasmid, das dem Maximum in der P0-Passage entspricht. Größere transfizierte Plasmidmengen in Zellen der P0-Passage führten in den infizierten Zellen zu einem leichten Rückgang der Reporterogenaktivität. Auch wenn kein VP30 in Zellen der P0-Passage exprimiert wurde, fand sich in den infizierten Zellen Reporterogenaktivität.

Es kann festgehalten werden, dass VP30 einen Einfluss auf die virale Transkription hat, und die Partikelausschleusung zu beeinflussen scheint.

4.2.5 Titrationsanalyse des Matrixproteins VP40

VP40 spielt im Virus als Matrixprotein beim Aufbau und der Ausschleusung der neugebildeten Virionen eine entscheidende Rolle und ist bei solitärer Expression in der Lage seine eigene Freisetzung auszulösen (Kolesnikova et al., 2004a;

Swenson et al., 2004). Um die Auswirkungen unterschiedlicher VP40-Plasmidmengen auf das iVLP-System zu untersuchen, wurden die Konzentrationen aller Plasmide konstant gehalten und nur die des pCAGGS-VP40 variiert. Es wurden 0,01 µg, 0,05 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,5 µg und 1 µg pCAGGS-VP40 zusammen mit den anderen Komponenten des iVLP-Systems transfiziert.

Die Zellen wurden lysiert und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Es zeigte sich eine konstante Zunahme von VP40 in Abhängigkeit von der transfizierten VP40-Plasmidmenge. Große Mengen VP40 erwiesen sich dabei als inhibitorisch für die Expression von Tubulin (Abb. 4.7 A). Die Reporterogenaktivität in den Zellen verlief bei Transfektion von 0,01 µg bis 0,5 µg VP40-DNA zunächst kontinuierlich; bei Mengen über 0,5 µg pCAGGS-VP40 zeigte sich eine Aktivitätsabnahme (Abb. 4.7 B). Die Western Blot Analyse der in den Überstand abgegebenen iVLPs zeigt, dass NP erst nachweisbar ist, wenn auch VP40 im Überstand der Zellen auftaucht. Somit ist VP40 essentiell für die Freisetzung von Partikeln. (Abb. 4.7 C). Dabei konnten VP40 und NP ab einer transfizierten Menge von 0,1 µg pCAGGS-VP40 in den iVLPs detektiert werden (Spur 3). Bei der in Abb. 4.7 D gezeigten Analyse der infizierten Zellen der P1-Passage zeigte sich wieder, dass die gemessene Reporterogenaktivität sensitiver ist als die Western Blot Analyse. Bevor VP40 in den VLPs detektierbar ist, lässt sich bereits schon Reporterogenaktivität in der P1-Passage nachweisen. Ab etwa 0,2 µg pCAGGS-VP40 wurde ein Plateau in der Aktivität erreicht; der Einsatz größerer Plasmidmengen führte hier zu keiner wesentlichen Aktivitätssteigerung mehr, aber auch zu keiner Abnahme.

Es kann festgehalten werden, dass die gesteigerte Expression von VP40 zu einer Abnahme der Reporterogenaktivität und der Tubulin-Expression in der P0-Passage führte. Im Gegensatz dazu wurde die Ausschleusung der iVLPs durch höhere Mengen an VP40 begünstigt.

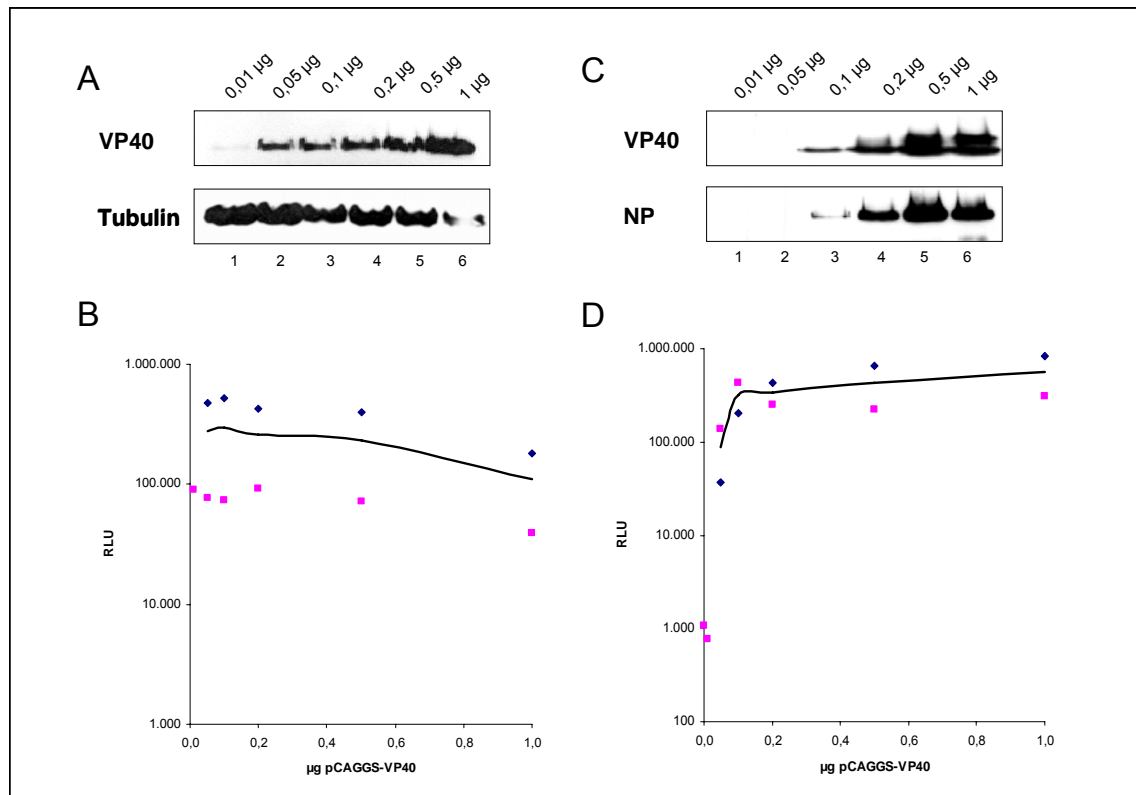


Abb. 4.7: Einfluss des Matrixproteins VP40 auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.

(A) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-GP und verschiedenen Mengen von pCAGGS-VP40 (0,01 µg; 0,05 µg; 0,1 µg; 0,2 µg; 0,5 µg; 1 µg) transfiziert und für 65 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Zur Antikörperfärbung der Blotmembranen wurden ein monoklonaler Maus anti-VP40 und ein Maus anti-Tubulin Antikörper verwendet, welche mit einem POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Zweitantikörper detektiert werden konnten. (B) Das Lysat wurde ferner zur Bestimmung der Reporterogenaktivität genutzt, indem die Renilla-Aktivität gemessen und mit der eingesetzten Menge an VP40-Plasmid korreliert wurde. (C) Der die iVLPs enthaltende Überstand wurde ultrazentrifugiert, die gereinigten iVLPs einem Proteinase K-Verdau unterzogen und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einem monoklonalen Maus anti-VP40 und anti-NP Antikörper gefärbt und diese durch einen sekundären POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. (D) HUH7-Zellen, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert. Nach Inkubation der Zellen für 65 h wurden diese lysiert und für einen zweiten Reporterassay verwendet.

4.2.6 Titrationsanalyse des Matrixproteins VP24

VP24 stellt ein weiteres Matrixprotein des MARV dar, welchem wahrscheinlich eine Rolle bei der Virusreifung zukommt (Bamberg et al., 2005). Um die Auswirkungen unterschiedlicher VP24-Plasmidmengen auf das iVLP-System zu untersuchen, wurden die Konzentrationen aller Plasmide konstant gehalten und

nur die des pCAGGS-VP24 variiert. Es wurden 0,01 μg , 0,05 μg , 0,1 μg , 0,2 μg , 0,5 μg und 1 μg pCAGGS-VP24 zusammen mit den anderen Komponenten des iVLP-Systems transfiziert.

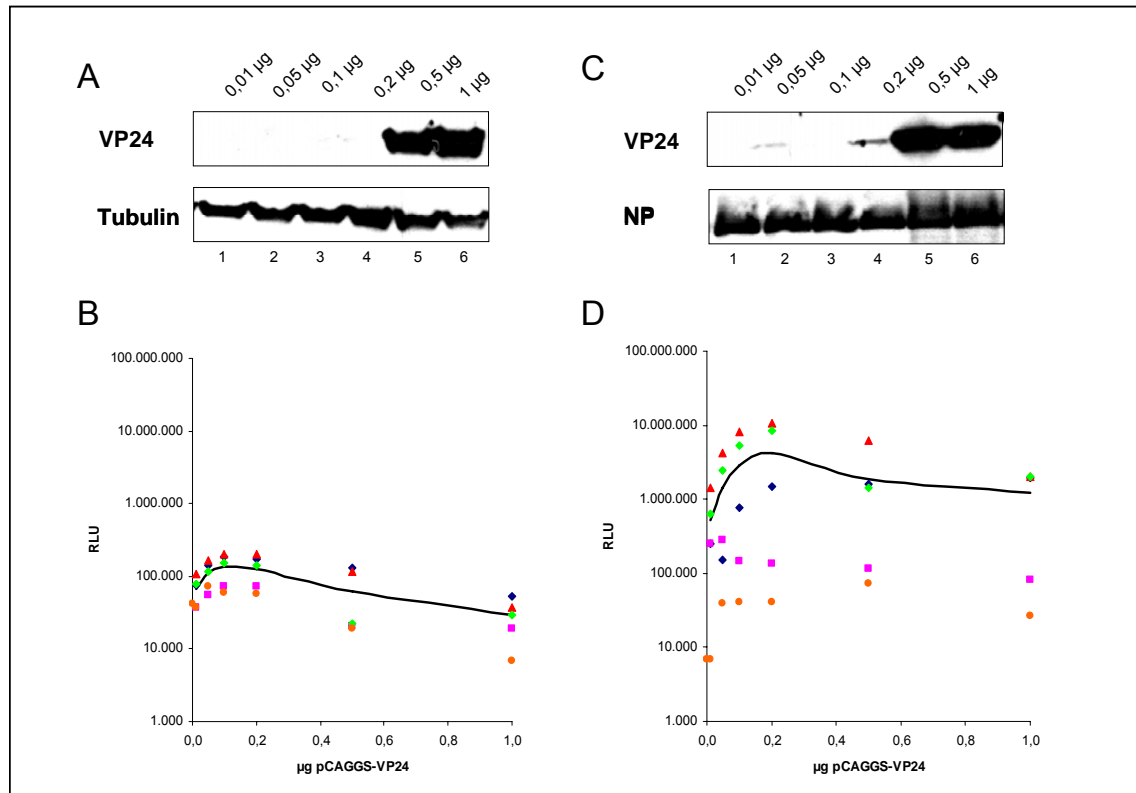


Abb. 4.8: Einfluss des Matrixproteins VP24 auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.

(A) 293-Zellen wurden mit 1 μg 3M-5M luc, 0,5 μg pCAGGS-T7, 1 μg pCAGGS-L, 0,5 μg pCAGGS-NP, 0,1 μg pCAGGS-VP35, 0,1 μg pCAGGS-VP30, 0,5 μg pCAGGS-VP40, 0,5 μg pCAGGS-GP und verschiedenen Mengen von pCAGGS-VP24 (0,01 μg ; 0,05 μg ; 0,1 μg ; 0,2 μg ; 0,5 μg ; 1 μg) transfiziert und für 65 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Zur Antikörperfärbung der Blotmembranen wurden ein polyklonaler Kaninchen anti-VP24 und ein monoklonaler Maus anti-Tubulin Antikörper verwendet, welche mit einem POD-gekoppelten Schwein anti-Kaninchen und Ziege anti-Maus Zweitantikörper detektiert werden konnten. (B) Das Lysat wurde ferner zur Bestimmung der Reportergenaktivität genutzt, indem die Renilla-Aktivität gemessen und mit der eingesetzten Menge an VP24-Plasmid korreliert wurde. (C) Der die iVLPs enthaltende Überstand wurde ultrazentrifugiert, die gereinigten iVLPs einem Proteinase K-Verdau unterzogen und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einem polyklonaler Kaninchen anti-VP24 und monoklonalen Maus anti-NP Antikörper gefärbt und diese durch einen sekundären POD-gekoppelten Schwein anti-Kaninchen und Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. (D) HUH7-Zellen, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert. Nach Inkubation der Zellen für 65 h wurden diese lysiert und für einen zweiten Reportergenassay verwendet.

Die Zellen wurden lysiert und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Im Zelllysate konnte VP24 erst bei Transfektion von 0,5 µg und 1 µg VP24-Plasmid detektiert werden, was sich durch den verwendeten nicht sehr sensitiven Antikörper erklärt (Abb. 4.8 A Spuren 5 und 6). Die Tubulin-Expression war in allen Ansätzen annähernd gleich (Abb. 4.8 A Spuren 1 – 6). Die Reportergenaktivität, dargestellt in Abb. 4.8 B, zeigte in den transfizierten Zellen ein gering ausgeprägtes Maximum bei Transfektion von 0,1 µg bis 0,2 µg pCAGGS-VP24. Bei größeren Mengen des Plasmids war ein leichter Rückgang der Reportergenaktivität zu verzeichnen, der auf eine inhibitorische Wirkung von VP24 hinweist. Das Fehlen von VP24 hatte keinen negativen Effekt auf die virale Transkription in den Zellen der P0-Passage.

Die in den Überstand abgegebenen iVLPs wurden einer Western Blot Analyse unterzogen. Hier ließ sich VP24 erwartungsgemäß erst detektieren, wenn die Zellen mit mehr als 0,5 µg Plasmid transfiziert wurden (Abb. 4.8 C Spuren 5 und 6). Die nachgewiesene Menge an NP, als Marker für die Menge gebildeter iVLPs, schien weitestgehend unbeeinflusst (Abb. 4.8 C). Die Reportergenanalyse der infizierten Zellen zeigte, ebenso wie die der transfizierten Zellen, ein Maximum bei 0,1 µg bis 0,2 µg transfiziertem VP24-Plasmid und einen Rückgang der Aktivität, wenn in Zellen der P0-Passage größere Mengen transfiziert wurden (Abb. 4.8 D).

VP24 scheint in diesem System nicht essentiell zu sein, da sich Reportergenaktivität, wenn auch vermindert, in Zellen der P1-Passage fand, selbst wenn diese mit iVLPs ohne VP24 infiziert wurden.

4.2.7 Titrationsanalyse des Oberflächenproteins GP

Das Glykoprotein GP ist als einziges Oberflächenprotein in Form eines Homotrimers in die Virushülle des MARV eingelagert (Feldmann et al., 1991). Es wird in die Membran der ausknospenden Virionen inkorporiert und vermittelt den Eintritt in die Wirtszelle über rezeptorvermittelte Endozytose (Kawaoka, 2005). GP wird in eine C-terminal gelegene cytoplasmatische Domäne, eine

Transmembrandomäne und eine N-terminale luminale Domäne gegliedert und repräsentiert ein klassisches Typ-I-Membranprotein (Will et al., 1993).

Um die Auswirkungen unterschiedlicher GP-Plasmidmengen auf das iVLP-System zu untersuchen, wurden die Konzentrationen aller Plasmide konstant gehalten und nur die des pCAGGS-GP variiert. Für die Titrationsanalyse wurden 0,01 µg, 0,05 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,5 µg und 1 µg pCAGGS-GP zusammen mit den anderen Komponenten des iVLP-Systems transfiziert.

Die Zellen wurden lysiert und das Lysat für eine Western Blot Analyse verwendet. Dabei ließ sich GP im Lysat ab einer Menge von 0,05 µg GP-Plasmid nachweisen (Abb. 4.9 A). Die Expression des zur Kontrolle untersuchten Tubulins wurde bei hohen GP-Konzentrationen leicht inhibiert, was möglicherweise auf cytotoxische Eigenschaften schließen lässt, die von EBOV GP bekannt sind (Spuren 5 und 6) (Yang et al., 2000). Die in Abb. 4.9 B dargestellte Reportergenanalyse der transfizierten Zellen zeigte, dass unterschiedliche GP-Mengen hier nahezu keinen Einfluss hatten.

Mittels Western Blot Analyse wurden die in den Überstand abgegebenen iVLPs untersucht. In den freigesetzten iVLPs konnte GP ab einer Plasmidmenge von 0,1 µg nachgewiesen werden (Abb. 4.9 C Spur 3 – 6). Während eine stetige Zunahme von GP in den iVLPs detektierbar war, blieb die Menge anderer viraler Proteine, hier am Beispiel von NP und VP40 gezeigt, konstant. Dies zeigt, dass bei gleicher Menge ausgeschleuster iVLPs die absolute Menge an GP pro Partikel zugenommen hat. In den infizierten Zellen stieg die Reportergenaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten GP-Plasmidmenge in den Zellen der P0-Passage an. Ab einer Menge von 0,5 µg pCAGGS-GP wurde nur noch eine geringe Steigerung der Reportergenaktivität beobachtet.

Die Titrationsanalyse ergab, dass GP erwartungsgemäß essentiell für die Infektion der P1-Passage ist, aber einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Reportergenaktivität in der P0-Passage hat. Eine Steigerung der Menge von inkorporiertem GP in die iVLPs verursachte eine gesteigerte Reportergenaktivität in der P1-Passage, was vermuten lässt, dass die Menge an GP die Infektiösität der iVLPs bestimmt. Wird die Menge an GP in den iVLPs weiter gesteigert, ergibt

sich weder eine erhöhte Infektiösität, noch eine Hemmung der Infektiösität. Die Aktivität des GP lässt sich bereits nachweisen, bevor die Sensitivität der Western Blot Analyse eine Detektion des Proteins in den iVLPs erlaubt.

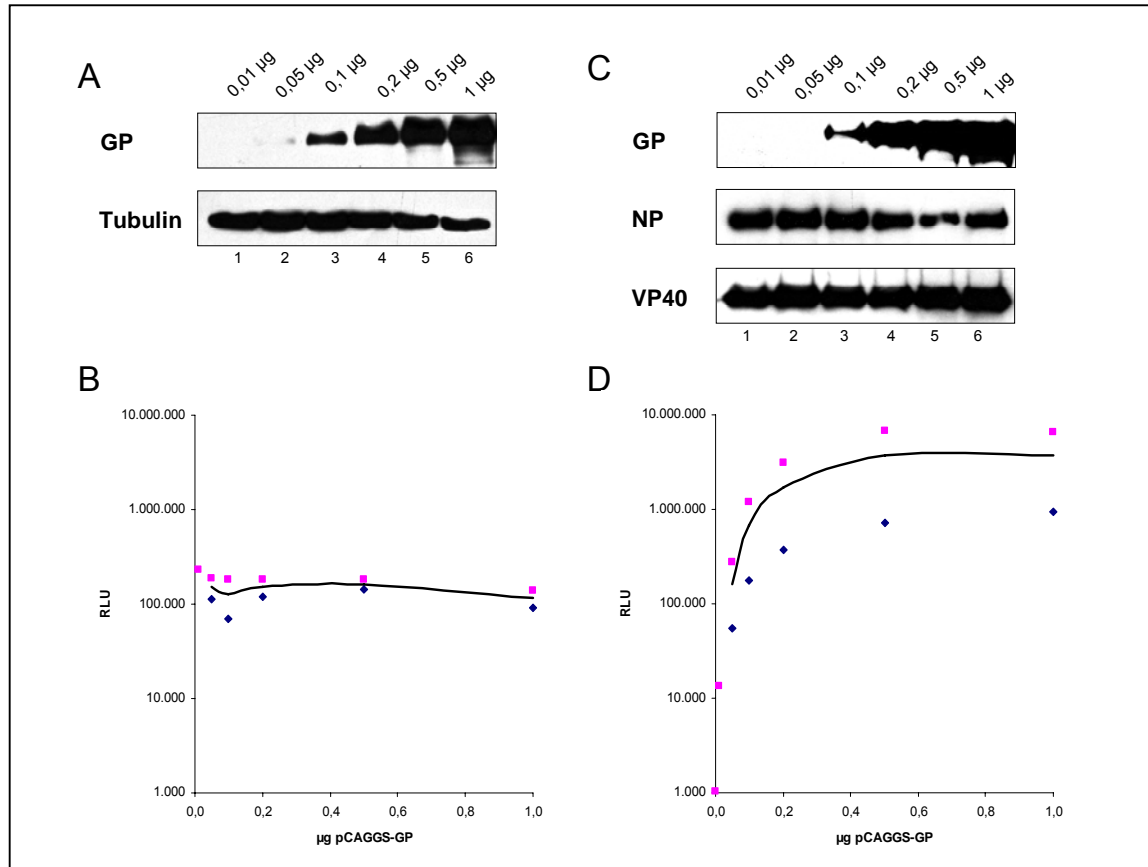


Abb. 4.9: Einfluss des Oberflächenproteins GP auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.

(A) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40 und verschiedenen Mengen von pCAGGS-GP (0,01 µg; 0,05 µg; 0,1 µg; 0,2 µg; 0,5 µg; 1 µg) transfiziert und für 65 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Zur Antikörperfärbung der Blotmembranen wurden ein monoklonaler Maus anti-GP und ein Maus anti-Tubulin Antikörper verwendet, welche mit einem POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Zweitantikörper detektiert werden konnten. (B) Das Lysat wurde ferner zur Bestimmung der Reporterogenaktivität genutzt, indem die Renilla-Aktivität gemessen und mit der eingesetzten Menge an GP-Plasmid korreliert wurde. (C) Der die iVLPs enthaltende Überstand wurde ultrazentrifugiert, die gereinigten iVLPs einem Proteinase K-Verdau unterzogen und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einem monoklonalen Maus anti-GP, anti-NP und anti-VP40 Antikörper gefärbt und diese durch einen sekundären POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. (D) HUH7-Zellen, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert. Nach Inkubation der Zellen für 65 h wurden diese lysiert und für einen zweiten Reportergenassay verwendet.

4.2.8 Titrationsanalyse des Minigenoms 3M-5M luc

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Plasmidmengen des Minigenoms auf das iVLP-System zu untersuchen, wurden die Konzentrationen aller Plasmide konstant gehalten und nur die des 3M-5M luc variiert. Es wurden 0,01 μg , 0,05 μg , 0,1 μg , 0,2 μg , 0,5 μg und 1 μg 3M-5M luc zusammen mit den anderen Komponenten des iVLP-Systems transfiziert.

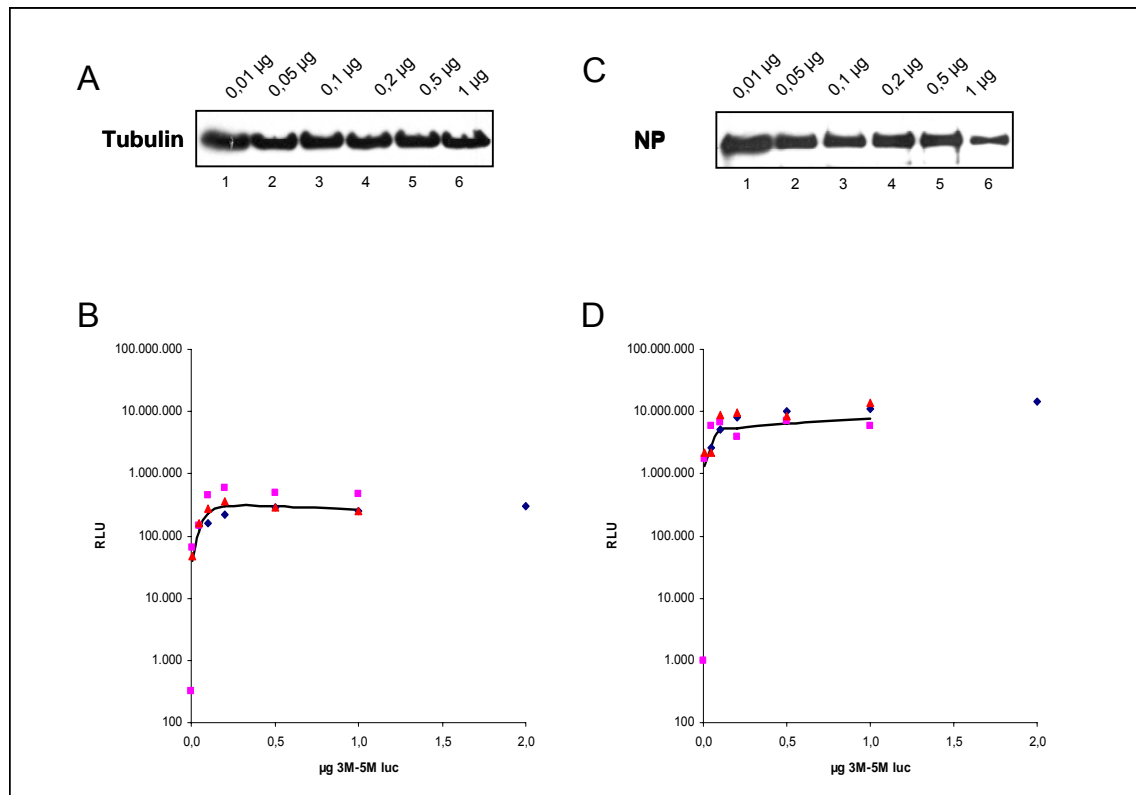


Abb. 4.10: Einfluss des Minigenoms 3M-5M luc auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.

(A) 293-Zellen wurden mit 0,5 μg pCAGGS-T7, 1 μg pCAGGS-L, 0,5 μg pCAGGS-NP, 0,1 μg pCAGGS-VP35, 0,1 μg pCAGGS-VP30, 0,07 μg pCAGGS-VP24, 0,5 μg pCAGGS-VP40, 0,5 μg pCAGGS-GP und verschiedenen Mengen von 3M-5M luc (0,01 μg ; 0,05 μg ; 0,1 μg ; 0,2 μg ; 0,5 μg ; 1 μg) transfiziert und für 65 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Zur Antikörperfärbung der Blotmembranen wurden ein monoklonaler Maus anti-Tubulin Antikörper verwendet, welcher mit einem POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Zweitantikörper detektiert werden konnte. (B) Das Lysat wurde ferner zur Bestimmung der Reportergenaktivität genutzt, indem die Renilla-Aktivität gemessen und mit der eingesetzten Menge an Minigenom-Plasmid korreliert wurde. (C) Der die iVLPs enthaltende Überstand wurde ultrazentrifugiert, die gereinigten iVLPs einem Proteinase K-Verdau unterzogen und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Membran mit einem monoklonalen Maus anti-NP Antikörper gefärbt und dieser durch einen sekundären POD-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. (D) HUH7-Zellen, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert. Nach Inkubation der Zellen für 65 h wurden diese lysiert und für einen zweiten Reportergenassay verwendet.

Die Zellen wurden lysiert und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Im Zelllysate konnte kein Einfluss auf die Tubulin-Expression beobachtet werden (Abb. 4.10 A). Die Reporteranalyse der Zellen zeigte, dass nach exponentieller Zunahme der Aktivität bei Transfektion von 0,2 µg des 3M-5M luc ein Plateau erreicht wurde; die Transfektion größerer Mengen Plasmid zeigte keine Steigerung der Reporteraktivität mehr (Abb. 4.10 B). Mittels Western Blot Analyse wurden die in den Überstand abgegebenen iVLPs untersucht. Detektiertes NP als Nachweis für die Menge gebildeter Partikel zeigte nahezu keine Beeinflussung (Abb. 4.10 C). Auch ohne Transfektion des Minigenoms wurden Partikel ausgeschleust (Daten nicht gezeigt). Die Reporteraktivität in den infizierten Zellen entsprach der in den transfizierten Zellen (Abb. 4.10 D). Es kann festgehalten werden, dass Mengen von mehr als 0,2 µg 3M-5M luc keinen verstärkenden Effekt auf die Reporteraktivität haben. Die Ausschleusung von iVLPs scheint indes unabhängig von der Menge des Minigenoms zu sein; so können auch Partikel ohne Genom gebildet werden.

4.2.9 Vergleich der Proteinverhältnisse im Marburg Virus und iVLP

Um die Verhältnisse der einzelnen Proteine zueinander im nativen MARV und den iVLPs zu vergleichen, wurden Zellen mit den in 3.2.6 beschriebenen Plasmidmengen transfiziert. Die aus dem Überstand der Zellen aufgereinigten iVLPs wurden in der Western Blot Analysen mit inaktivierten Viren (3.2.5) verglichen. Es wurden jeweils NP und ein weiteres virales Protein gleichzeitig detektiert und durch sekundäre Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Emissionsspektren sichtbar gemacht (3.3.7). Wie in Abb. 4.11 zu sehen, wurde die Signalstärke der angefärbten Proteine quantifiziert (Tabelle). Da die Antikörper die verschiedenen Proteine mit unterschiedlich guter Qualität binden, war ein Vergleich der gemessenen Signale und Rückschluss auf die einzelnen Proteinmengen nicht direkt möglich. Daher wurde jeweils das Verhältnis der einzelnen Proteine zu NP beurteilt.

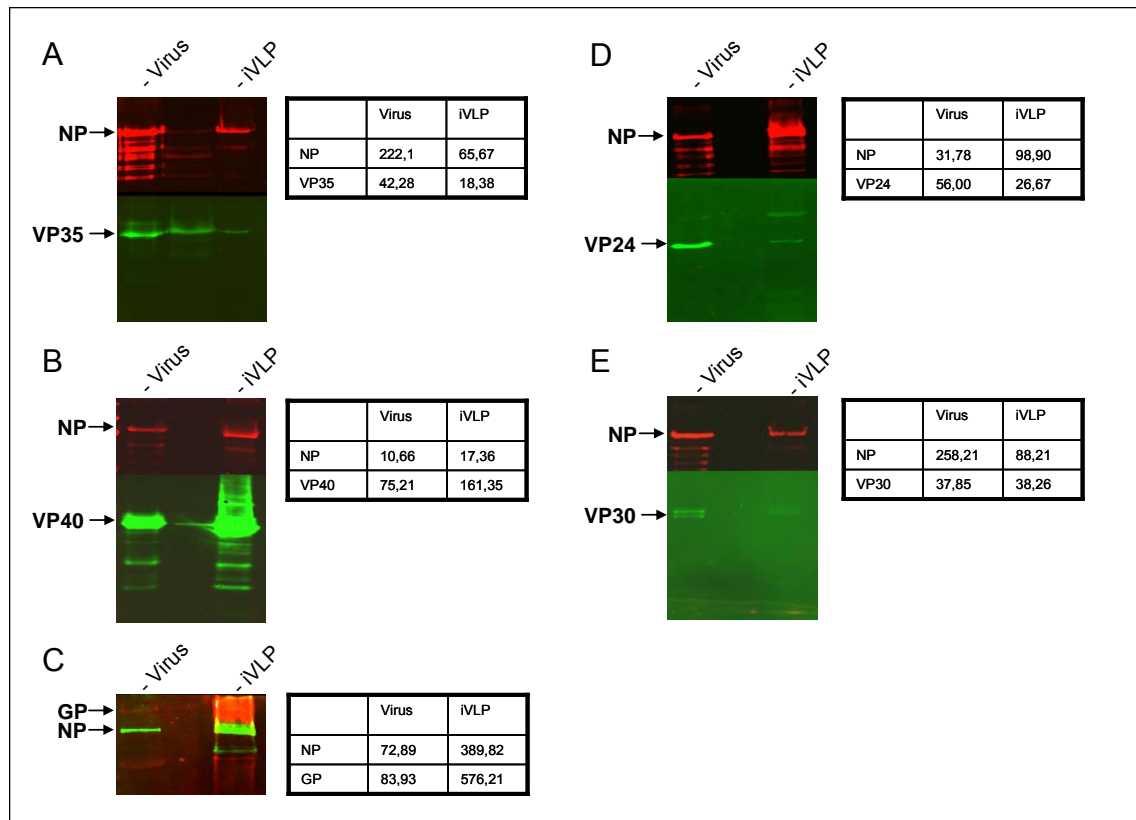


Abb. 4.11: Vergleich der Proteinverhältnisse im Marburg Virus und iVLP.

(A-D) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40 und 0,5 µg pCAGGS-GP transfiziert, für 65 h inkubiert und die in den Zellkulturüberstand freigesetzten iVLPs mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt. Diese wurden zusammen mit inaktiviertem MARV mittels SDS-Page und Western Blot Analyse untersucht. Die Membranen wurden mit einem monoklonalen Maus anti-NP Antikörper inkubiert, welcher mit einem sekundären Fluorophor-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper (680 nm) detektiert wurde. Außerdem wurde mit anti-VP35 Meerschweinchenserum (A), monoklonalem anti-VP40 Antikörper aus der Maus (B), anti-VP24 Kaninchenserum (D) und monoklonalem anti-VP30 aus der Maus (E) gefärbt. (C) Eine Färbung erfolgte mit einem anti-NP Kaninchenserum und einem anti-GP Meerschweinchenserum. Als sekundäre Antikörper wurden Fluorophor-gekoppelte Ziege anti-Maus (800 nm), Ziege anti-Kaninchen (800 nm) und Ziege anti-Meerschweinchen Antikörper (800 nm) verwendet. Das Auslesen der Fluoreszenz und die Quantifizierung erfolgten mit dem Odyssey (Licor).

Es zeigte sich, dass das Signal für NP im Virus fünfmal höher ist, als das Signal für VP35 und ein viermal höheres NP als VP35 Signal im iVLP zu detektieren war (Abb. 4.11 A). Beim Vergleich von NP zu VP40 konnte festgestellt werden, dass im Virus die VP40-Signalstärke etwa siebenmal und im iVLP neunmal über der von NP lag (Abb. 4.11 B). Die GP-Signalstärke entsprach im Virus der 1,2-fachen an NP, im iVLP der 1,5-fachen Stärke (Abb. 4.11 C). Für VP35, NP, und

GP ist daher festzuhalten, dass sich die Signalstärke im iVLP und Virus in etwa entsprechen.

Unterschiede zeigten sich bei der Detektion von VP24 und VP30. Während im Virus zweimal mehr VP24 als NP vorhanden war, lag die VP24-Menge im iVLP viermal niedriger als die Menge an NP (Abb. 4.11 D). Die Western Blot Analyse für VP30 zeigte, dass dessen Menge ein siebenfaches der Menge an NP im Virus, aber nur ein zweifaches der Menge im iVLP entsprach (Abb. 4.11 E). Dabei muss berücksichtigt werden, dass beide Antikörper, wie auch schon in der Titrationsanalyse zu sehen (4.2.4; 4.2.6), nicht sehr sensitiv sind, was eine Interpretation dieser Daten erschwert.

Die Proteinverhältnisse im iVLP entsprechen denen im nativen Virus weitestgehend für VP35, VP40 und GP, dagegen weichen diese für VP24 und VP30 ab.

4.3 Unterscheidung sphärischer und filamentöser Partikel

Es konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Expression von VP40 die Bildung von VLPs induziert, wobei Form und Länge dieser Partikel sehr variabel sind. Es wurde bereits beschrieben, dass bei der Bildung von VLPs sowohl filamentöse als auch sphärische Formen vor kommen (Kolesnikova, 2009). Um die mit dem iVLP-System gebildeten iVLPs hinsichtlich ihrer Morphologie und Infektiosität zu charakterisieren, wurden die aus Zellkulturüberständen durch Ultrazentrifugation gereinigten iVLPs auf einen Nycodenz-Gradienten aufgebracht und durch den zweiten Zentrifugationsschritt aufgrund ihrer Dichte separiert (Abb. 4.12 A) (3.2.11).

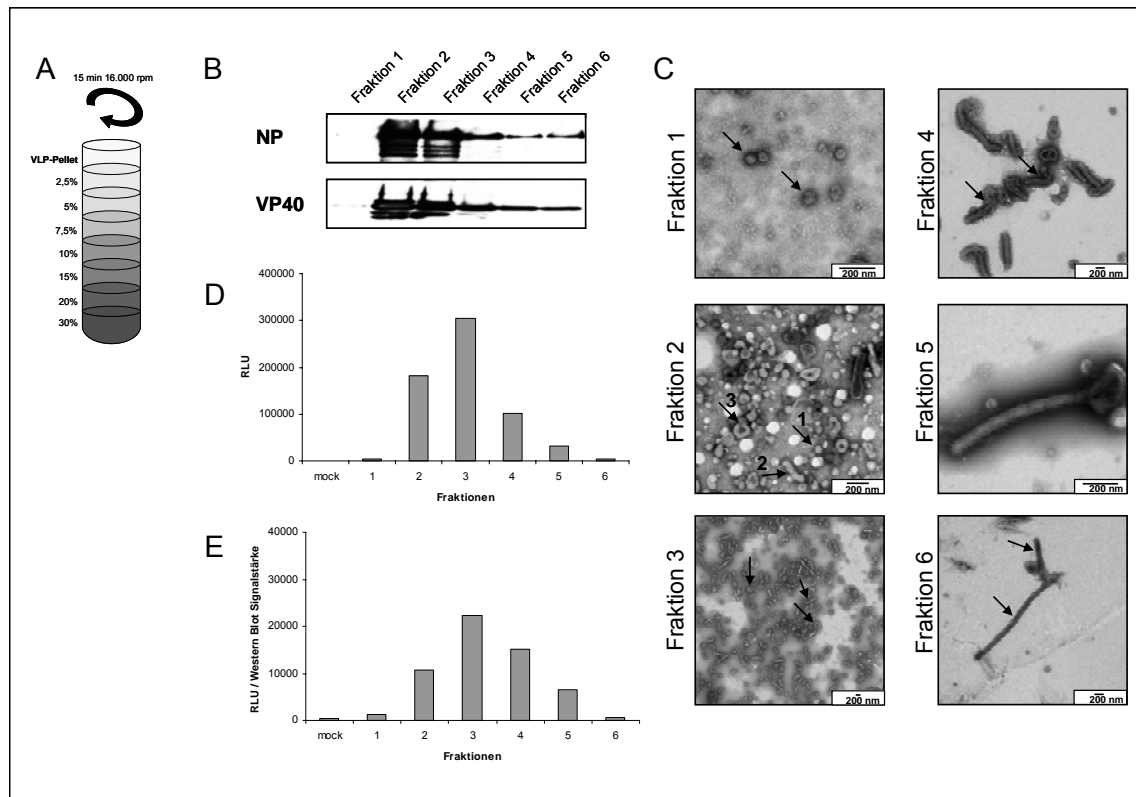


Abb. 4.12: Unterscheidung sphärischer und filamentöser Partikel.

(A-E) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40 und 0,5 µg pCAGGS-GP transfiziert und für 65 h inkubiert. Die in den Überstand abgegebenen iVLPs wurden durch einen dreistündigen Ultrazentrifugationsschritt in einem TST41-Rotor bei 40.000 Upm und 4°C ankonzentriert und anschließend sphärische und filamentöse Partikel in einem weiteren Ultrazentrifugationsschritt mit einem TST60-Rotor bei 16.000 Upm und 4°C für 15 min über einen siebenstufigen Nycodenzgradienten (30%, 20%, 15%, 10%, 7,5%, 5%, 2,5% Nycodenz in TNE) voneinander getrennt (A). Die oberen sechs Fraktionen à 500 µl wurden abgenommen, Fraktionen 1-3 und 4-6 vereint, in einem abschließenden Ultrazentrifugationsschritt mit einem TLA55-Rotor bei 45.000 Upm und 4°C für 2 h pelletiert und in TNE aufgenommen. Partikel der sechs Fraktionen wurden für folgende Analysen verwendet: (B) die Proteine der iVLPs wurden in einer Western Blot Analyse über SDS-Page separiert und anschließend auf Membranen geblottet. Die Detektion der Proteine erfolgte über monoklonale anti-VP40 und anti-NP Antikörper aus der Maus, welche mittels eines POD-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörpers aus Kaninchen sichtbar gemacht wurden. (C) Mit 5% PFA in DMEM (-) versetzt, wurden die iVLPs mittels Negativfärbung im Elektronenmikroskop analysiert, um zwischen sphärischen und filamentösen Partikeln zu differenzieren. (D) Zur Bestimmung der Infektiosität der einzelnen Fraktionen wurden HUH7-Zellen infiziert, welche zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren. Nach einer 65-stündigen Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Renilla-Reportergenaktivität bestimmt. (E) Infektiosität angegeben als Reportergenaktivität in Bezug auf die Signalstärke der einzelnen Fraktionen im Western Blot.

Im Anschluss wurden dem Gradienten sechs Fraktionen von oben nach unten entnommen und diese durch einen dritten Ultrazentrifugationsschritt so konzentriert, dass die enthaltenen iVLPs für Western Blot Analysen, elektronenmikroskopische Betrachtungen und Infektionen verwendet werden konnten (3.3.3, 3.3.12, 3.2.7).

In der Western Blot Analyse der iVLPs wurden NP und VP40 als virale Markerproteine nachgewiesen um die Menge der Partikel pro Fraktion abzuschätzen. Hierbei zeigte sich, dass NP und VP40 in Fraktion 1 kaum nachweisbar waren, wogegen das stärkste Signal in Fraktion 2 detektiert werden konnte, gefolgt von Fraktionen 3 und 4. Ein schwächeres Signal fand sich in den Fraktionen 5 und 6 (Abb. 4.12 B).

Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung konnten in den Fraktionen sphärische und filamentöse Formen der iVLPs unterschieden werden. In Fraktion 1 wurden nur sehr wenige Partikel gefunden, welche alle eine sphärische Form aufwiesen (Abb. 4.12 C Fraktion 1 Pfeile). In den Fraktionen 2 und 3 fand sich die größte Anzahl von Partikeln, die sowohl sphärische als auch kurze filamentöse Formen aufwiesen (Abb. 4.12 C Fraktion 2; Pfeil „1“ – sphärischer Partikel, Pfeil „2“ – filamentöser Partikel). Als Sonderform der filamentösen Erscheinung konnten auch Partikel mit „Donut“-Form entdeckt werden (Abb. 4.12 C Fraktion 2; Pfeil „3“). Während Fraktion 2 vorwiegend sphärische Partikel enthält, kommen in Fraktion 3 vorwiegend filamentöse Partikel vor, die zu unterschiedlichen Formen gebogen sind. In den Fraktionen 4 bis 6 lagen filamentöse Partikel in unterschiedlicher Länge vor (Abb. 4.12 C Fraktionen 4-6 Pfeile). Während in den Fraktionen 4 und 5 die Partikel oft der typischen „9“-förmigen Erscheinung des MARV entsprachen, waren nur wenige, dafür aber sehr lange Partikel in Fraktion 6 anzutreffen (Abb. 4.12 C Fraktion 6 Pfeil).

Um die Infektiosität der Partikel zu unterscheiden wurden Zellen mit iVLPs der einzelnen Fraktionen infiziert. Die gemessene Reporterogenaktivität der infizierten HUH7-Zellen, dargestellt in Abb. 4.12 D, zeigte folgende Verteilung: Fraktionen 1 und 6 wiesen kaum Aktivität auf, während es in den anderen Fraktionen zu einem klar vom Hintergrund unterscheidbaren Signal kam. Dabei wurde die

stärkste Reportergenaktivität in Fraktion 3 gemessen, gefolgt von Fraktionen 2, 4 und 5.

Fasst man die Ergebnisse der drei Analysen zusammen, so lässt sich vermuten, dass rein sphärische Partikel, wie sie in Fraktion 1 anzutreffen waren, nicht infektiös sind. Fraktion 1, welche nahezu nur sphärische Partikel enthielt, zeigte nahezu keine Reportergenaktivität. In Fraktion 2 befanden sich, anhand des Western Blots erkennbar, mehr virale Proteine als in Fraktion 3. Sieht man die Reportergenaktivität als Maß für die Infektiösität an, so waren die Partikel der Fraktion 2 weniger infektiös als die der Fraktion 3. Fraktion 4 zeichnete sich wie auch Fraktion 5 durch eine geringere Infektiösität aus; beachtet man jedoch die Gesamtproteinmenge in diesen Fraktionen, so lässt sich festhalten, dass die wenigen Partikel der Fraktion 5 zu äußerst hohen Aktivitäten führten. Fraktion 6 wies im Vergleich zu Fraktion 5 die gleiche Menge an Protein, aber eine wesentlich geringere Infektiösität auf (Abb. 4.12 E).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es hinsichtlich der Infektiösität optimale Partikel bestimmter Form und Größe gibt. Abweichungen von diesem Typ, sei es in Form von sphärischen oder extrem langen filamentösen Partikeln, führten zu einer geringeren Infektiösität.

4.4 Einfluss viraler Proteine auf zelluläre Transkription

Die Titrationsexperimente ergaben, dass einige der viralen Proteine in höherer Konzentration die Reportergenaktivität negativ beeinflussten. Dieser Effekt sollte genauer untersucht werden.

4.4.1 Inhibitorische Funktion des VP40 auf virale und zelluläre Transkription

Im Zuge der Titrationsanalyse konnte gezeigt werden, dass große Mengen des VP40-Plasmids, bzw. hohe intrazelluläre Konzentrationen an VP40, eine inhibitorische Wirkung auf die Reportergenaktivität des Minigenoms und die

Tubulin-Expression hatten (4.2.5). Letzteres kann als Indiz für eine Inhibition der zellulären Transkription interpretiert werden.

Um die Auswirkungen von VP40 auf die zelluläre Transkription zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen des VP40-Plasmids mit einem Vektor transfiziert, welcher die Transkription der Firefly-Luziferase unter der Kontrolle eines Polymerase II-Promotors erlaubt (pGL4). Die Firefly-Luziferase ist ein Enzym des nordamerikanischen Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) und setzt ihr Substrat, D-Luziferin, in Oxyluziferin um, wobei grünes Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm emittiert wird (Wood et al., 1984). Der pGL4-Vektor wurde zusammen mit 0 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg und 2 µg pCAGGS-VP40 in 293-Zellen transfiziert und die resultierenden Firefly-Reportergenaktivitäten bestimmt. Es zeigte sich ein exponentieller Abfall der Reportergenaktivität in Abhängigkeit von der Menge des VP40-Plasmids, was eine Inhibition zellulärer Transkription bestätigt. Die Reportergenaktivität (y), aufgetragen gegen die Menge des VP40-Plasmids (x), folgt dabei der Funktion $y=13,422e^{-0,9507x}$ (Abb. 4.13 A).

Somit schien VP40 sowohl die zelluläre als auch die virale Transkription zu beeinflussen. Um zu untersuchen, ob der Einfluss von VP40 auf zelluläre und virale Transkription voneinander abhängt und die Hemmung der viralen Transkription nur Folge der Hemmung der zellulären Transkription ist, wurden Versuche mit Actinomycin D durchgeführt. Actinomycin D ist ein Peptid-Antibiotikum aus Streptomyceten, welches in DNA interkaliert und so die zelluläre mRNA-Synthese inhibiert (White and Phillips, 1988). Wurde der pGL4-Vektor in 293-Zellen transfiziert und diese nach 16 h mit Konzentrationen von 0 – 1000 ng/ml Actinomycin D behandelt, so ließ sich bei der Firefly-Reportergenaktivität ein Rückgang in Abhängigkeit von der Actinomycin D Menge beobachten. Die Reportergenaktivität (y), aufgetragen gegen die Actinomycin D Menge (x), folgt dabei der Funktion $y=5,5713e^{-0,0042x}$ (Abb. 4.13 B).

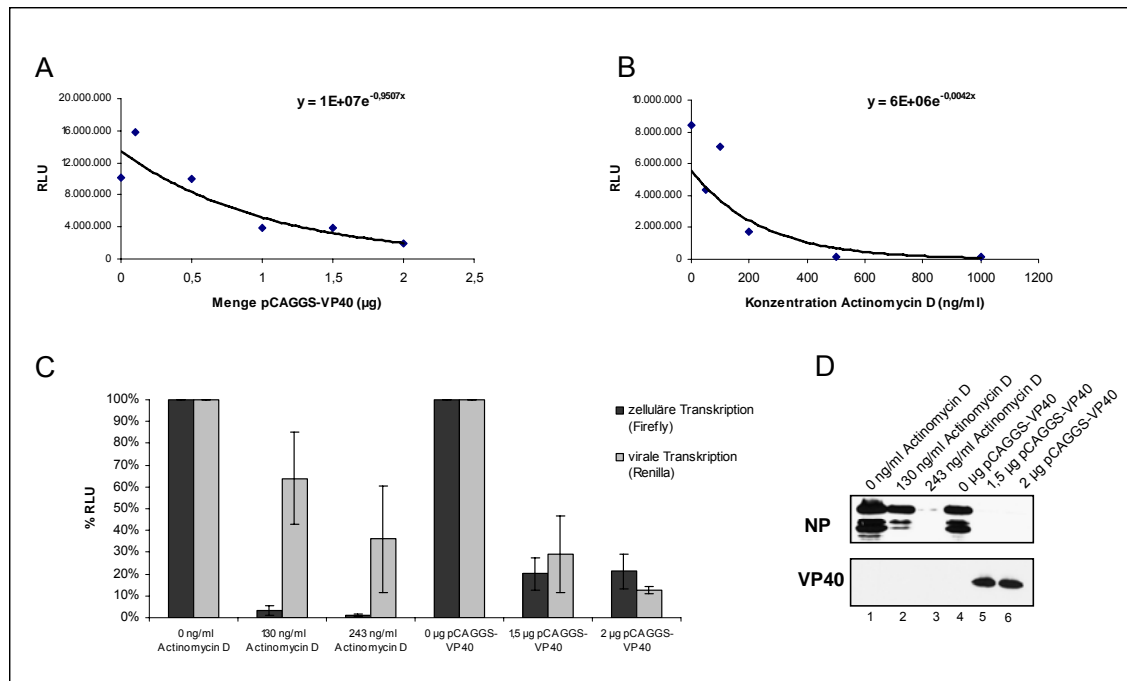


Abb. 4.13: Inhibition von viraler und zellulärer Transkription durch VP40 .

(A) 293-Zellen wurden mit 0 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg und 2 µg pCAGGS-VP40 sowie 0,1 µg pGL4 transfiziert und für 65 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate für einen Firefly-Reporterassay verwendet. Die Aktivität (y), aufgetragen gegen die verwendete Konzentration an VP40-Plasmid (x), folgte der Funktion $y = 1E+07e^{-0.9507x}$. (B) Alternativ wurden 293-Zellen mit 0,1 µg pGL4 transfiziert und nach 16 h mit Medium inkubiert, welches 0 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml Actinomycin D enthielt. Die Zellen wurden 65 h nach der Transfektion lysiert und die Firefly-Reporteraktivität bestimmt. Die Aktivität (y), aufgetragen gegen die Menge an Actinomycin D (x), folgte der Funktion $y = 6E+06e^{-0.0042x}$. (C) Die Quantifizierung machte die Vorhersage möglich, dass sich gleiche Reporteraktivitäten bei Verwendung von 1,5 µg bzw. 2 µg pCAGGS-VP40 und 130 ng/ml bzw. 243 ng/ml Actinomycin D ergeben. Zum Vergleich zellulärer und viraler Transkription wurden 293-Zellen zum einen mit 0,1 µg pGL4 (schwarzer Balken) und zum anderen mit 1 µg 3M-5M luc, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30 und 0,5 µg pCAGGS-T7 transfiziert (grauer Balken). Diese Zellen wurden zusätzlich mit 0 µg, 1,5 µg oder 2 µg pCAGGS-VP40 transfiziert bzw. 0 ng/ml, 130 ng/ml und 243 ng/ml Actinomycin D behandelt. Die Firefly- (schwarzer Balken) oder Renilla- (grauer Balken) Reporteraktivität wurde nach 65 h in den lysierten Zellen bestimmt. (D) Zur Western Blot Analyse wurde das Zelllysate über SDS-Page separiert und anschließend geblottet. Der Blot wurde mit einem monoklonalen Maus anti-NP und anti-VP40 Antikörper inkubiert und über POD-gekoppelte Kaninchen anti-Maus Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

Gleiche Reporteraktivitäten ergeben sich somit für VP40 und Actinomycin D-Konzentrationen aus dem Gleichsetzen beider Funktionen und Auflösung nach x (Actinomycin D). Daraus folgt:

$$x(\text{Actinomycin}) = 226,36 * x(\text{VP40}) - 209,34$$

So konnte berechnet werden, dass die Transfektion von 1,5 µg bzw. 2 µg pCAGGS-VP40 zur gleichen Firefly-Reportergenaktivität führen sollte, wie die Inkubation mit 130 ng/ml bzw. 243 ng/ml Actinomycin D.

Um zwischen dem Einfluss von VP40 auf virale und zelluläre Transkription zu differenzieren, wurden 0 µg, 1,5 µg und 2 µg pCAGGS-VP40 bzw. 0 ng/ml, 130 ng/ml und 243 ng/ml Actinomycin D zusammen mit dem Minigenom 3M-5M luc (virale Transkription) oder pGL4 (zelluläre Transkription) transfiziert bzw. inkubiert. Bei allen Ansätzen wurden die anderen Expressionsplasmide des iVLP-Systems (pCAGGS-L, -NP, -VP35, -VP30, -VP24, -GP, -T7) ebenfalls transfiziert. Die Transfektion von 1,5 µg bzw. 2 µg pCAGGS-VP40 führte zu einem Rückgang der zellulären Transkription auf 20,1% bzw. 20,2% der Aktivität ohne Transfektion von VP40. Die virale Transkription ging dabei auf 29,1% bzw. 12,6% der ursprünglichen Aktivität zurück (Abb. 4.13 C). Beim Einsatz von 130 ng/ml bzw. 243 ng/ml Actinomycin D fand sich nur noch eine Reportergenaktivität von 3,3% bzw. 0,9% im Vergleich zur Kontrolle. Die virale Transkription zeigte einen Rückgang bei einer Konzentration von 130 ng/ml auf 64% und bei 243 ng/ml auf 36,2% der ursprünglichen Aktivität (Abb. 4.13 C).

Als Kontrolle wurde die in Abb. 4.13 D dargestellte Western Blot Analyse mit den Lysaten der Zellen durchgeführt und NP und VP40 detektiert. Es zeigte sich ein Rückgang der NP-Menge in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Actinomycin D. Vergleicht man die NP-Menge bei Anwesenheit von VP40 mit der ohne VP40, so ist bereits ab 1,5 µg VP40-Plasmid kein NP mehr im Zelllysat nachweisbar.

Zusammenfassend zeigte sich bei Behandlung der Zellen mit Actinomycin D ein überwiegender Rückgang der zellulären Transkription, während die Anwesenheit von VP40 sich sowohl auf die zelluläre als auch auf die virale Transkription inhibierend auswirkte. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Inhibition der zellulären Transkription durch VP40 nicht die Ursache für die Hemmung der viralen Transkription sein kann. Wenn die zelluläre Transkription durch Actinomycin vollständig gehemmt wird, ist die virale Transkription in dem gewählten Zeitfenster immer noch möglich.

4.4.2 Einfluss von VP24 und VP35 auf die zelluläre Transkription

Während die Titrationsanalyse ergab, dass höhere intrazelluläre Konzentrationen an VP35 eine starke Inhibition viralen Transkription und eine Hemmung der Tubulin-Expression zur Folge hatten, konnte die Rolle des VP24 nicht eindeutig geklärt werden (4.2.5, 4.2.7). Ob diese beiden Proteine einen Einfluss auf die zelluläre Transkription haben, sollte im Folgenden untersucht werden.

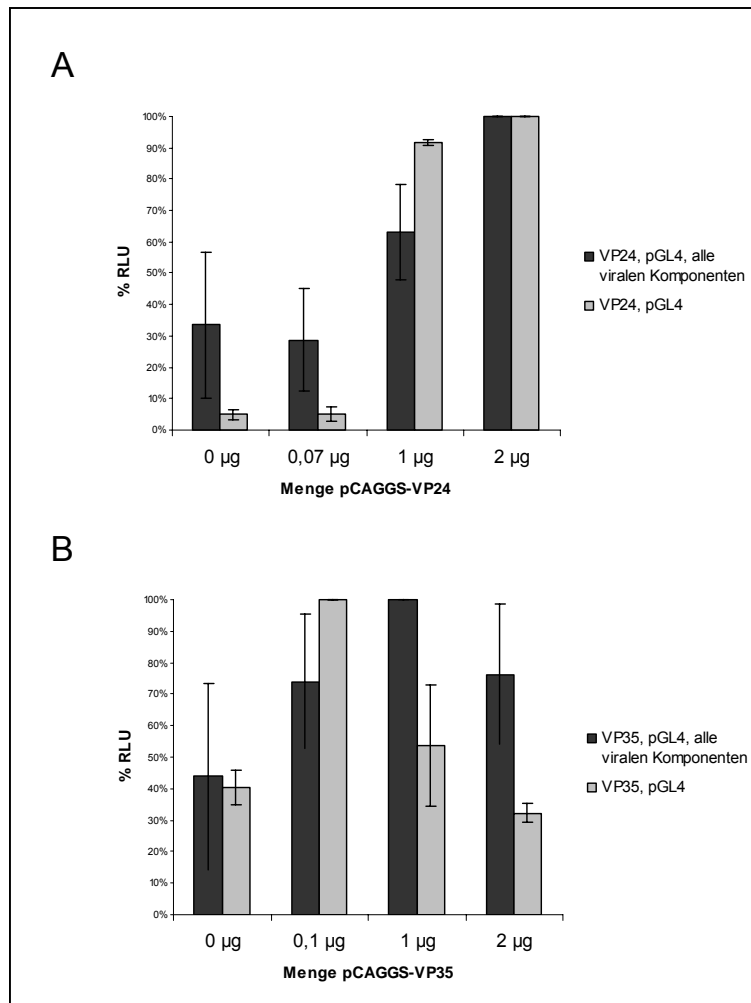


Abb. 4.14: Einfluss von VP24 und VP30 auf die zelluläre Transkription.

(A-B) 293-Zellen wurden mit 0,1 µg pGL4 (schwarze Balken) oder 0,1 µg pGL4, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,5 µg pCAGGS-VP40, 0,5 µg pCAGGS-GP und 0,5 µg pCAGGS-T7 (graue Balken) transfiziert. Zusätzlich wurde zu beiden Ansätzen jeweils 0 µg, 0,07 µg, 1 µg oder 2 µg pCAGGS-VP24 (A) bzw. 0 µg, 0,1 µg, 1 µg oder 2 µg pCAGGS-VP35 (B) transfiziert und die Firefly-Reportergenaktivität nach 65 h im Zelllysate detektiert.

Hierzu wurde der pGL4-Vektor, der die Expression des Firefly-Gens unter einem zellulären Promotor erlaubt, in Kombination mit 0 µg, 0,07 µg, 1 µg und 2 µg pCAGGS-VP24 bzw. 0 µg, 0,1 µg, 1 µg und 2 µg pCAGGS-VP35 in 293-Zellen transfiziert. Um den möglichen Einfluss anderer viraler Proteine auf den beobachteten inhibitorischen Effekt zu untersuchen, wurde pCAGGS-VP24 bzw. pCAGGS-VP35 sowohl alleine als auch mit allen anderen Expressionsplasmiden

(pCAGGS-L, -NP, -VP35, -VP30, -VP24, -VP40 -GP) kotransfiziert und die Firefly-Reportergenaktivität gemessen.

In Abhängigkeit von der Menge des VP24-Plasmids konnte hierbei eine Steigerung der zellulären Transkription gefunden werden. Während die zelluläre Transkription durch die üblicherweise im System verwendeten Menge von 0,07 µg pCAGGS-VP24 nahezu unbeeinflusst war, stieg die Aktivität der zellulären Transkription bei Transfektion von 1 µg bzw. 2 µg pCAGGS-VP24 stark an (Abb. 4.14 A graue Balken). Auch in Gegenwart der anderen Expressionsplasmide war die Reportergenaktivität bei einer Transfektion von 1 µg oder 2 µg pCAGGS-VP24 gesteigert (Abb. 4.14 A schwarze Balken).

Bei Transfektion verschiedener Mengen des VP35-Plasmids zeigte sich ein Maximum der zellulären Transkription bei Transfektion von 0,1 µg pCAGGS-VP35. Bei Mengen von 1 µg bzw. 2 µg VP35-Plasmid entsprach die zelluläre Transkription derjenigen in Abwesenheit von VP35 (Abb. 4.14 B graue Balken). Das Maximum der Aktivität lag bei Kotransfektion der anderen Expressionsplasmide bei 1 µg VP35-Plasmid (Abb. 4.14 B schwarze Balken).

Es kann festgehalten werden, dass sich die Anwesenheit viraler Proteine höchst unterschiedlich auf die zelluläre Transkription auswirkt. Höhere Konzentrationen an VP24 scheinen die zelluläre Transkription zu fördern.

4.5 Einfluss von VP40 auf die virale Replikation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich VP40 inhibierend auf die virale und zelluläre Transkription auswirkt, sollte nun die Beeinflussung der viralen Replikation untersucht werden. Ein methodisches Problem dieser Arbeit, das erst gegen Ende der Dissertation gelöst werden konnte, bestand darin, dass sich das Minigenom vor dem Hintergrund des transfizierten Minigenomplasmids nur sehr schlecht über reverse Transkription und anschließende PCR nachweisen ließ. Insofern mussten andere Methoden herangezogen werden, um die Menge an replizierter Minigenom-RNA zu bestimmen. Folgender Ansatz wurde gewählt:

Da nur das replizierte Minigenom spezifisch in iVLPs verpackt wird, sollte die Reporterogenaktivität die die iVLPs in P1-Passage Zellen induzieren als Maß für die Replikation in P0-Passage Zellen herangezogen werden.

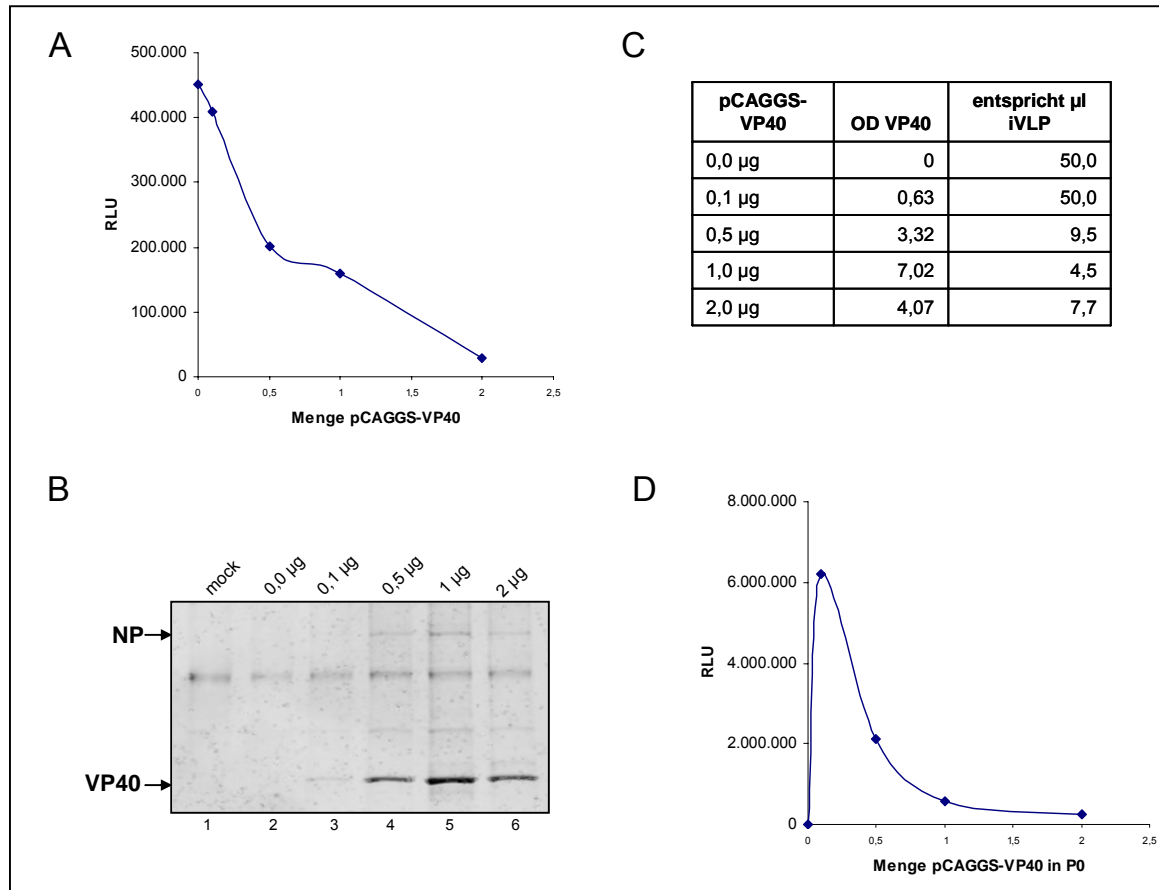


Abb. 4.15: Einfluss von VP40 auf die virale Replikation.

(A) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-GP und 0 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg oder 2 µg pCAGGS-VP40 transfiziert und die Zellen für 65 h inkubiert. Zellen und der Überstand wurden getrennt. Die Zellen wurden lysiert und die Renilla-Reporterogenaktivität bestimmt. (B) Der die iVLPs enthaltende Zellkulturüberstand wurde ultrazentrifugiert und die Proteine des iVLP-Pellets über SDS-Page aufgetrennt und im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt. Der Blot wurde mit monoklonalen Maus anti-NP und anti-VP40 Antikörpern inkubiert und diese mit Fluorophorgekoppelten Kaninchen anti-Maus Sekundärantikörpern (680 nm) sichtbar gemacht. (C) Die quantitative Auswertung der unterschiedlichen Mengen an VP40 erfolgte mittels Odyssey (Licor). (D) Die Volumina der iVLP-Proben, die für die Infektion der P1-Zellen verwendet wurden, wurden so eingestellt, dass in allen Ansätzen die gleiche Menge an VP40 vorlag. HUH7- Zellen, welche zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren, wurden mit den iVLPs infiziert und nach 65 h das Lysat für ein Reportergenassay verwendet.

Da jedoch die Titration des VP40 in P0-Zellen auch zu verstärkter Ausschleusung von Partikeln, unabhängig von der Anwesenheit des Minigenoms führte, musste der VP40-Gehalt von iVLPs zunächst quantifiziert werden. Die

Menge der verwendeten iVLPs wurde dann so gewählt, dass alle P1-Zellen mit der gleichen Menge an VP40 infiziert wurden. Vorausgesetzt, dass damit eine gleiche Partikelanzahl gewährleistet war, sollten gemessene Unterschiede in der Reporterogenaktivität in Zellen der P1-Passage der Menge an eingebautem Minigenom in den VLPs und damit in der Menge an gebildeter genomischer Minigenom RNA äquivalent sein.

Es wurden 293-Zellen mit 0 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg und 2 µg pCAGGS-VP40 im Zuge des iVLP-Systems transfiziert und zunächst die Reporterogenaktivität in P0-Zellen bestimmt. Abb. 4.15 A zeigt, wie erwartet, eine Abnahme der Reporterogenaktivität in Abhängigkeit von der VP40-Plasmidmenge. Die ausgeschleusten iVLPs wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert und einer Western Blot Analyse unterzogen. Mit zunehmender Menge transfiziertem VP40-Plasmid war ein Anstieg an iVLPs, erkennbar an der Menge NP und VP40, zu beobachten (Abb. 4.15 B). Dabei verhielt sich das Verhältnis von VP40 zu NP in allen Ansätzen annähernd gleich. Im Folgenden wurde davon ausgegangen, dass die Menge an VP40 im Überstand mit der Menge an ausgeschleusten iVLPs korreliert. Die Menge an VP40 in den ausgeschleusten VLPs wurde quantifiziert und für die Infektion von P1-Zellen gleiche Konzentrationen an VP40 eingesetzt (Abb. 4.15 C). Über die Reporterogenaktivität der infizierten Zellen ließ sich nun der Minigenomgehalt der iVLPs indirekt bestimmen, was wiederum Aussagen über die Replikation in den transfizierten Zellen zuließ.

So fand sich ein Maximum der Reporterogenaktivität bei der Infektion mit iVLPs, die in den Zellen der P0-Passage durch Transfektion von 0,1 µg pCAGGS-VP40 gebildet worden waren. Ohne Anwesenheit von VP40 ließ sich erwartungsgemäß keine Aktivität verzeichnen, da keine VLPs ausgeschleust wurden. Die Reporterogenaktivität in den infizierten Zellen sank in Abhängigkeit von der in Zellen der P0-Passage transfizierten VP40-Plasmidmenge (Abb. 4.15 D). Da für alle Infektionen die gleiche Menge an VP40 eingesetzt wurde, ließ sich dieser Effekt nicht auf die partikelbildende Funktion von VP40 zurückführen, sondern darauf, dass diese Proben weniger Minigenom enthielten. Große Mengen an VP40 in den Zellen führten demnach zu einer Abnahme von Minigenom in den

iVLPs (Abb. 4.15). Dies spricht für einen inhibitorischen Effekt des VP40 auch auf die virale Replikation.

4.6 Anwendungsmöglichkeiten des iVLP-Systems

Um den Einfluss von Substanzen, wie beispielsweise neutralisierenden Antikörpern oder chemischen Inhibitoren, auf die Infektion mit iVLPs zu untersuchen, sollte das System zunächst auf ein 96-Lochplatten-Format umgestellt werden. Dies ermöglicht einen hohen Durchsatz von Proben, die eine vier- bzw. achtfache Bestimmung derselben Wirkstoffkonzentration ermöglicht. Dies ist für die statistische Absicherung der Experimente essentiell.

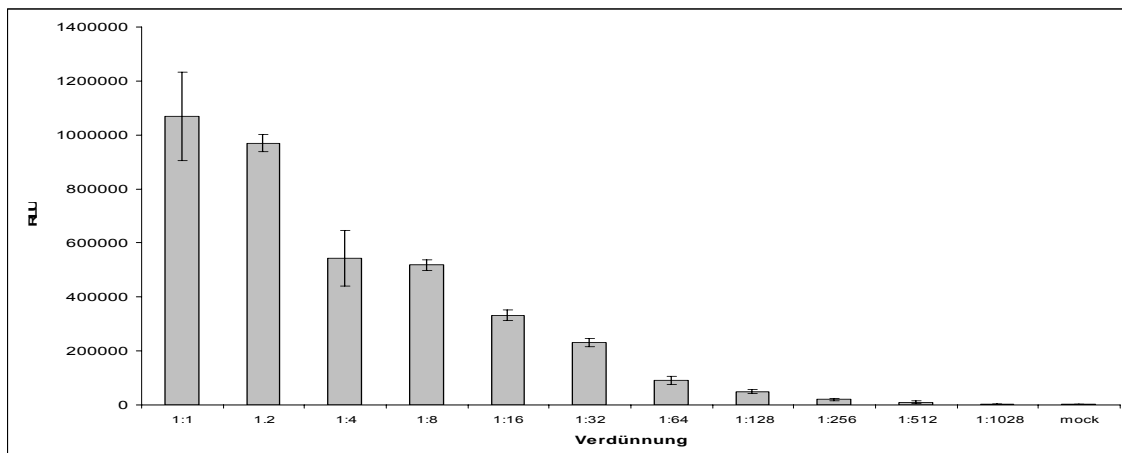


Abb. 4.16: Bestimmung der minimalen infektiösen Dosis.

293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40 und 0,5 µg pCAGGS-GP (Menge pro 9 cm²-Zellkulturmonolayer) transfiziert und die in den Zellkulturüberstand abgegebenen iVLPs durch Ultrazentrifugation gereinigt. HUH7-Zellen wurden mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert und 16 h später trypsinisiert und in 96-Lochplatten ausgesät, in denen die Lumineszenz direkt detektiert werden konnte. Die HUH7-Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen der iVLPs infiziert und für 1,5 h inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für 48 h inkubiert und anschließend die Reportergenaktivität in den Zellen bestimmt.

Zunächst sollte die minimale infektiöse Dosis bestimmt werden. Diese entspricht der höchsten iVLP-Verdünnung, bei der sich noch ein klar vom Hintergrund unterscheidbares Reportersignal findet. HUH7-Zellen wurden mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert und 16 h später in 96-Lochplatten ausgesät, in denen die Lumineszenz direkt detektiert werden konnte. Die Zellen wurden mit

verschiedenen Verdünnungen der iVLPs infiziert und 48 h später die Reporterogenaktivität bestimmt. Es zeigte sich, dass die Detektion durch das üblicherweise verwendete Renilla-Luziferase Kit zu sehr großen Abweichungen innerhalb der Mehrfachbestimmung führte. Statt der sogenannten „flash“-Lumineszenz der Renilla-Luziferase, welche nur für wenige Sekunden detektierbar ist, wurde daher das „EnduRenTM Life Cell-Substrat“ von Promega verwendet. Durch seine hydrophobe Struktur ist es membrangängig, wird intrazellulär modifiziert und führt zur „glow“-Lumineszenz, einem für etwa 24 h detektierbaren Signal.

Abb. 4.16 zeigt die Reporterogenaktivität aufgetragen gegen die iVLP-Verdünnung. Die Reporterogenaktivität nahm in Abhängigkeit von der iVLP-Verdünnung exponentiell ab. Höhere iVLP-Verdünnungen als 1:128 unterschieden sich nicht mehr von Zellen, die nicht infiziert worden waren (mock), so dass diese Verdünnung als minimale infektiöse Dosis definiert wurde. Bei allen nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde die minimale infektiöse Dosis im Vorfeld bestimmt und dann für die jeweiligen Experimente verwendet.

4.6.1 Analyse eines neutralisierenden Serums

Zur Bestimmung neutralisierender Eigenschaften von Antikörpern und Seren gegen MARV ist man auf Infektionen mit nativem Virus in einem Sicherheitslabor der Stufe 4 angewiesen (BSL-4). Hier sollte ein Testsystem basierend auf den iVLPs entwickelt werden, um neutralisierende Eigenschaften auch unter S1 Bedingungen bestimmen zu können.

Neutralisierende Antikörper binden so an die Oberflächenproteine viraler Partikel, dass deren Bindung an die Zielzelle oder andere Funktionen wie Fusionseigenschaften inhibiert werden und damit die Infektion verhindert wird. Es wurde erwartet, dass neutralisierende Antikörper das GP in den iVLPs inaktivieren und damit die Infektion von Zellen der P1-Passage verhindern. Bei Verwendung des iVLP-Systems sollte in diesem Fall kein Reportergensignal mehr detektierbar sein.

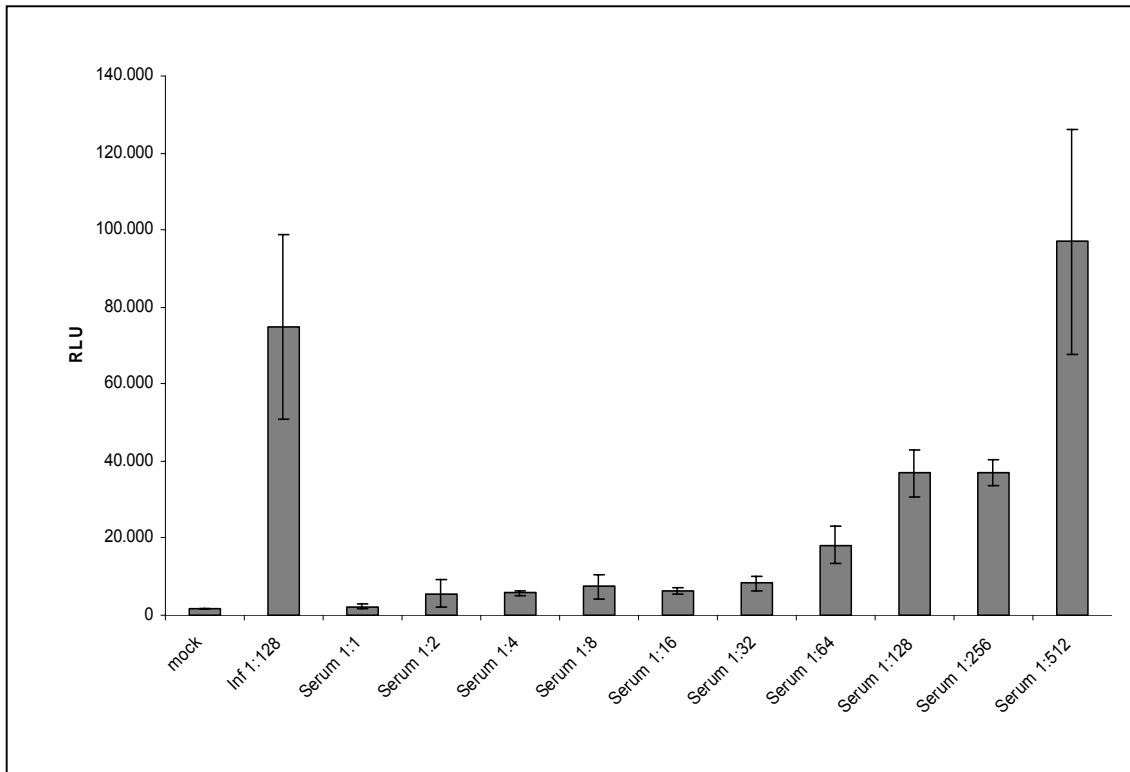


Abb. 4.17: Analyse eines neutralisierenden Serums.

Die minimale infektiöse Dosis von MARV iVLPs wurde mit Verdünnungen eines Ziege anti-MARV Serums für 1 h bei RT inkubiert und auf HUH7-Zellen gegeben, welche zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 vortransfiziert worden waren. Nach 1,5 h wurde ein Medienwechsel vorgenommen und 48 h später erfolgte die Bestimmung der Renilla-Reporterogenaktivität. Als Kontrollen wurden nicht infizierte (mock) und infizierte Zellen ohne vorherige Inkubation mit Serum verwendet.

Die einer minimalen infektiösen Dosis von 1:128 entsprechende Menge iVLPs wurde mit unterschiedlichen Verdünnungen des Ziege anti-MARV (37-6) Serums inkubiert. Anschließend wurden mit den behandelten iVLPs transfizierte HUH7-Zellen infiziert und die Reporterogenaktivität 48 h später bestimmt.

Abb. 4.17 zeigt die Reporterogenaktivität aufgetragen gegen die Verdünnungen des Ziege anti-MARV Serums. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock) und Zellen, die mit der minimalen infektiösen Dosis iVLPs infiziert wurden (Inf. 1:128). Es konnte beobachtet werden, dass bei Verdünnungen des Serums von 1:1 bis 1:32 die Reporterogenaktivität in den infizierten Zellen auf dem Niveau von nicht infizierten Zellen lag. Verdünnungen zwischen 1:64 und 1:256 zeigten Reporterogenaktivitäten, jedoch lagen diese deutlich unter der Aktivität von Zellen, die nicht mit dem Serum inkubiert worden waren (Inf. 1:128). Durch Verwendung

eines Zytotoxizitätstests konnte ausgeschlossen werden, dass der Rückgang der Reporterogenaktivität auf eine toxische Wirkung des Serums zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

Demnach scheint für den Rückgang der Reporterogenaktivität die neutralisierende Eigenschaft des Ziege anti-MARV Serums verantwortlich zu sein und sich das iVLP-System für die Bestimmung neutralisierender Aktivität von Seren zu eignen. Leider lagen bis zum Ende der Doktorarbeit keine Analysen des Ziegeserums hinsichtlich der neutralisierenden Aktivität infektiöser MARV Partikel vor, so dass Vergleiche nicht möglich sind.

4.6.2 Einfluss von Peptiden aus menschlichem Samen auf die Infektion mit iVLPs

Die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) kann durch ein Protein, welches aus humanem Sperma isoliert wurde, stark erhöht werden. Es handelt sich dabei um einen Proteinabschnitt der sauren Prostata-Phosphatase (PAP aa 248-286), welcher Fibrillen ausbildet und die Aufnahme von HIV in Zellen um ein Vielfaches verstärkt. Der Proteinabschnitt wurde als „Semen-derived Enhancer of Virus Infection“ (SEVI) bezeichnet (Munch et al., 2007). Filoviren sind bei einer Infektion im Sperma nachweisbar und spermatogene Übertragung von Filoviren wurden berichtet (Martini and Schmidt, 1968; Simpson, 1977). Im Folgenden wurde der Einfluss von SEVI auf die Infektion mit MARV und EBOV iVLPs analysiert. Da für HIV bereits gezeigt werden konnte, dass die Steigerung der Infektion bei hohen Virusverdünnungen stärker ausgeprägt ist, wurde auch hier die minimale infektiöse Dosis der iVLPs benutzt. Die verdünnten iVLPs wurden mit Konzentrationen von 0 µg/ml, 0,4 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml SEVI für 10 min inkubiert und im Anschluss auf transfizierte HUH7-Zellen gegeben. Nach 48 h wurde die Reporterogenaktivität bestimmt.

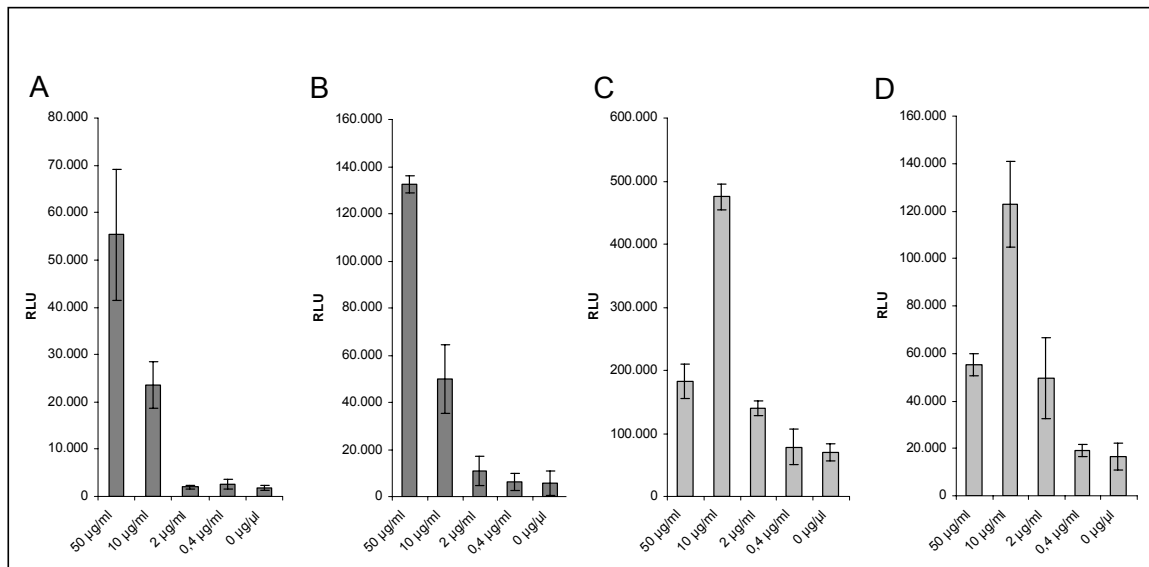


Abb. 4.18: Einfluss von Peptiden aus menschlichem Samen auf die Infektion mit iVLPs.

(A-D) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40 und 0,5 µg pCAGGS-GP (Menge pro 9 cm²-Zellkulturmonolayer) und alternativ mit 0,25 µg 3E-5E luc, 0,25 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-EBOV-L, 0,125 µg pCAGGS-EBOV-NP, 0,125 µg pCAGGS-EBOV-VP35, 0,075 µg pCAGGS-EBOV-VP30, 0,03 µg pCAGGS-EBOV-VP24, 0,25 µg pCAGGS-EBOV-40 und 0,25 µg pCAGGS-EBOV-GP (Menge pro 9 cm²-Zellkulturmonolayer) transfiziert und die in den Zellkulturüberstand freigesetzten iVLPs durch Ultrazentrifugation gereinigt. Eine Verdünnung von 1:8 (A) bzw. 1:32 (B) der EBOV iVLPs und eine Verdünnung von 1:16 (C) bzw. 1:64 (D) der MARV iVLPs wurde für 10 min mit 50 µg/ml, 10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml oder 0 µg/ml „Semen-derived Enhancer of Virus Infection“ (SEVI) inkubiert und für 2 h auf HUH7-Zellen gegeben, welche mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren. Das Medium wurde gewechselt und nach einem 48-stündigen Inkubationsschritt die Renilla-Reportergenaktivität in den Zellen detektiert.

Zellen, welche mit EBOV iVLP infiziert wurden, zeigten eine Erhöhung der Reportergenaktivität in Abhängigkeit von der SEVI-Konzentration im Medium: die höchste Konzentration von 50 µg/ml SEVI führte zu einer 23fachen Erhöhung der Reportergenaktivität bei einer iVLP-Verdünnung von 1:8 bzw. einer 31fachen Steigerung bei einer Verdünnung von 1:32 (Abb. 4.18 A und B).

Ein Einfluss von SEVI auf die Infektion mit MARV iVLPs konnte ebenfalls bestätigt werden, der Effekt war aber weniger ausgeprägt. Bei Inkubation mit einer iVLP-Verdünnung von 1:16 oder 1:64 konnte bei Inkubation mit 10 µg/ml SEVI eine Erhöhung der Reportergenaktivität um das siebenfache gezeigt werden. Die Reportergenaktivität bei Verwendung von 50 µg/ml SEVI entsprach ungefähr der bei Inkubation mit 2 µg/ml SEVI (Abb. 4.18 C und D).

Es kann festgehalten werden, dass die Anwesenheit von SEVI während der Infektion mit iVLPs die Reporterogenaktivität in den infizierten Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration erhöht. Dieser Effekt scheint von der Verdünnung der iVLPs abzuhängen und ist bei EBOV iVLPs im Gegensatz zu MARV iVLPs ausgeprägter.

4.6.2.1 Spezifität der Infektionssteigerung durch SEVI

Um zu klären, ob der Grund für den SEVI-vermittelten Anstieg der Reporterogenaktivität in einer Steigerung der iVLP-Infektion lag oder sich auf eine nicht rezeptorvermittelte Aufnahme der iVLPs zurückführen lässt, wurden iVLPs ohne das Oberflächenprotein GP hergestellt.

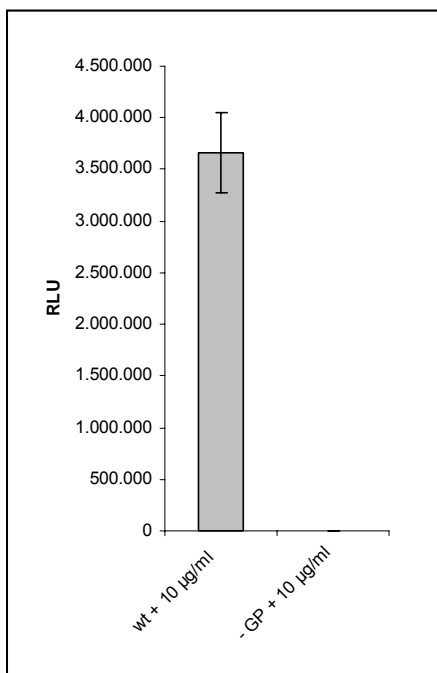


Abb. 4.19: Spezifität der Infektionssteigerung durch SEVI.

293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40 und 0,5 µg pCAGGS-GP und alternativ ohne pCAGGS-GP (Menge pro 9 cm²-Zellkulturmonolayer) transfiziert. Die aufgereinigten iVLPs wurden mit 10 µg/ml SEVI inkubiert und für 2 h auf HUH7-Zellen gegeben, welche mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 vortransfiziert worden waren. Das Medium wurde gewechselt und nach einem 48-stündigen Inkubationsschritt die Renilla-Reporterogenaktivität detektiert.

Hierzu wurden Zellen im Zuge des iVLP-Systems mit allen Expressionsplasmiden außer pCAGGS-GP transfiziert (-GP). Die so gebildeten iVLPs sind zwar membranumhüllt, enthalten aber auf der Oberfläche kein GP und sollten daher nicht in der Lage sein, Zellen zu infizieren. Als Kontrolle wurden iVLPs verwendet, welche aus Zellen stammten, die mit allen Plasmiden transfiziert worden waren (wt). Bei der Infektion von transfizierten HUH7-Zellen

mit diesen verschiedenen Partikeln wurde eine SEVI-Konzentration von 10 µg/ml im Medium verwendet.

Abbildung 4.19 zeigt die Reportergenaktivität in den infizierten Zellen: iVLPs aus Zellen, die mit allen Expressionsplasmiden transfiziert wurden, führten zur Reportergenaktivität, während iVLPs ohne GP kein Signal in den infizierten Zellen auslösten.

Dies zeigt, dass iVLPs ohne Oberflächenprotein nach Inkubation mit SEVI nicht in der Lage sind, Zielzellen zu infizieren, was für eine spezifische Verstärkung der rezeptorvermittelten Aufnahme durch SEVI spricht.

4.6.2.2 Einfluss von Samen und Samenflüssigkeit auf die EBOV iVLP Infektion

Für HIV ist beschrieben, dass auch humanes Sperma einen Infektions-erhöhenden Einfluss ausübt, der wahrscheinlich durch SEVI vermittelt wird. Es sollte auch für Filoviren untersucht werden, ob humanes Sperma Einfluss auf die Infektiösität von iVLPs besitzt.

Sperma wurde zunächst durch Zentrifugation in die Bestandteile Samen (SE) und Samenflüssigkeit (SF) getrennt. Die minimale infektiöse Dosis von EBOV iVLPs, die bei der Infektion einem stärkeren Einfluss von SEVI als MARV iVLPs unterlagen, wurden mit 50%, 10%, 2%, 0,4% und 0% SE bzw. SF für 10 min inkubiert. Eine 1:30 Verdünnung des Ansatzes wurde zur Infektion von transfizierten HUH7-Zellen gegeben. Durch die hohe Verdünnung sollte die toxische Wirkung auf die Zellen verringert werden. Abb. 4.20 zeigt die 48 h später gemessene Reportergenaktivität in den infizierten Zellen bei Inkubation mit SE (A) und SF (B). Bei der Inkubation mit SE ist eine Reportergenaktivität in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration zu beobachten. Die höchste Konzentration von 50% SE führte im Gegensatz zu 10% SE wieder zu einer Verminderung der Reportergenaktivität (Abb. 4.20 A). Die Verteilung der Reportergenaktivitäten aufgetragen gegen die Konzentration von SF verlief ähnlich, jedoch weniger ausgeprägt. Die maximale Reportergenaktivität fand sich bei Inkubation mit 10% SF (Abb. 4.20 A).

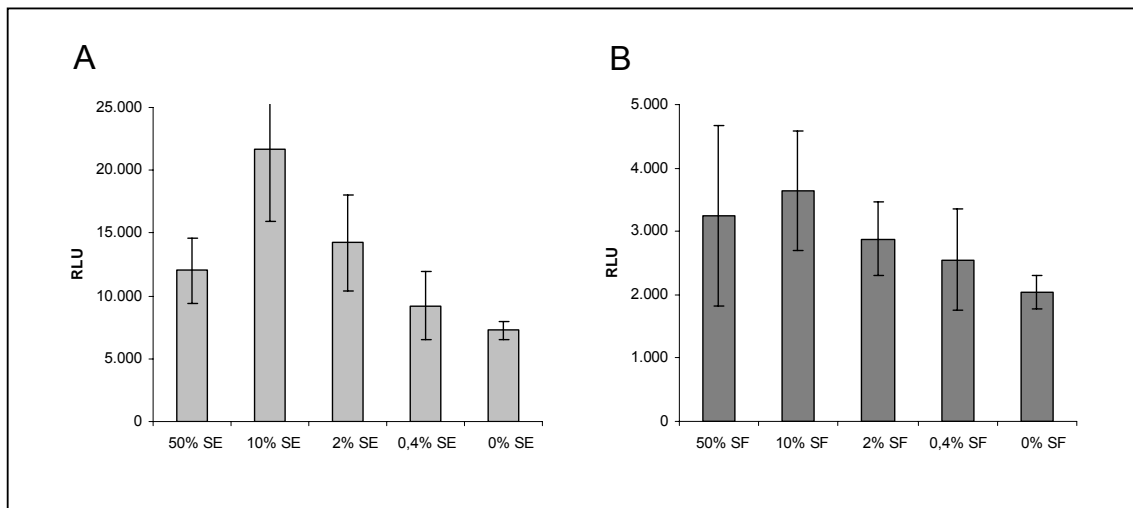


Abb. 4.20: Einfluss von Samen und Samenflüssigkeit auf die EBOV iVLP Infektion.

(A-B) 293-Zellen wurden mit 0,25 µg 3E-5E luc, 0,25 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-EBOV-L, 0,125 µg pCAGGS-EBOV-NP, 0,125 µg pCAGGS-EBOV-VP35, 0,075 µg pCAGGS-EBOV-VP30, 0,03 µg pCAGGS-EBOV-VP24, 0,25 µg pCAGGS-EBOV-VP40 und 0,25 µg pCAGGS-EBOV-GP (Menge pro 9 cm²-Zellkulturmonolayer) transfiziert und die in den Zellkulturüberstand abgegebenen EBOV iVLPs durch Ultrazentrifugation gereinigt und mit Samen (A) bzw. Samenflüssigkeit (B) inkubiert, welche zuvor durch Zentrifugation getrennt worden waren. Hierzu wurden 50%, 10%, 2%, 0,4% und 0% Samen bzw. Samenflüssigkeit mit iVLPs versetzt und eine Verdünnung von 1:30 auf HUH7-Zellen gegeben, welche mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren. Das Medium wurde gewechselt und nach einem 48-stündigen Inkubationsschritt die Renilla-Reportergenaktivität detektiert.

Es kann festgehalten werden, dass die Inkubation von EBOV iVLPs mit Sperma während der Infektion eine Erhöhung der Reportergenaktivität in infizierten Zellen zur Folge hat, was für eine infektionssteigernde Wirkung von Sperma spricht.

4.6.3 Einfluss von Carbocyclic-3-deaza Adenosin, 3-deaza-Neplanocin A, Interferon und Ribavirin auf die Infektion mit iVLPs

Um die Wirksamkeit antiviraler Substanzen gegen natives MARV zu testen, ist man auf Arbeiten in einem Sicherheitslabor der Stufe 4 angewiesen. Um ein Screening von Bibliotheken potentiell antiviralen Molekülen durchzuführen, müssen Roboter-unterstützte Verfahren angewandt werden, die im hohen Durchsatz Substanzen auf antivirale Eigenschaften hin testen. Ein solches Screening unter BSL-4 Bedingungen zu etablieren ist äußerst schwierig, vielleicht unmöglich. Als Alternative bietet sich das iVLP System an, das viele

Schritte des MARV Replikationszyklus nachstellt, aber unter S1-Bedingungen durchgeführt werden kann.

Vorversuche mit Referenzkomponenten, von denen eine allgemeine antivirale Wirkung bekannt ist, wurden am Rega-Institut in Leuven, Belgien in der Arbeitsgruppe von Dr. Pieter Leyssen zusammen mit Dr. Suzanne Kaptein und Stijn Delmotte durchgeführt. Als Referenzkomponenten wurden Carbocyclic-3-deaza-Adenosin und 3-deaza-Neplanocin A ausgewählt, welche S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) Hydrolase-Inhibitoren sind. Zudem wurde Ribavirin, ein Inosin 5'-Monophosphat Dehydrogenase Inhibitor, sowie Interferon, eine Substanz, die intrazelluläre antivirale Abwehrmechanismen auslöst, verwendet.

Es wurden jeweils 50 µg/ml, 10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml und 0 µg/ml von Carbocyclic-3-deaza Adenosin, 3-deaza-Neplanocin A und Ribavirin bzw. 10.000 U, 2.000 U, 400 U, 80 U und 0 U Interferon zu transfizierten HUH7-Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen mit iVLPs-Verdünnungen von 1:50, 1:75 und 1:100 infiziert und nach 48 h die Reporterogenaktivität bestimmt. Parallel wurden HUH7-Zellen in transparenten 96-Lochplatten ausgesät und mit den Referenzkomponenten in gleicher Verdünnung inkubiert, jedoch nicht infiziert, um nach einer 48-stündigen Inkubation einen Toxizitätstest durchzuführen. Für den Test wurden die Zellen mit 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) für 1,5 h inkubiert; dieser gelbe Farbstoff wird von metabolisch aktiven Zellen zu einem braunen Farbstoff umgesetzt, während diese Reaktion im toxischen Milieu unterbleibt. Der Grad dieser Aktivität wurde quantifiziert und in Bezug zu den infizierten Zellen gesetzt. Für Carbocyclic-3-deaza Adenosin konnte gezeigt werden, dass nur die höchste Konzentration des Inhibitors von 50 µg/ml zu einem Abfall der Reporterogenaktivität führte. In der Toxizitätsanalyse zeigte sich, dass in diesem Bereich von einer leicht toxischen Wirkung auszugehen ist, so dass sich der Rückgang der Reporterogenaktivität vermutlich hierdurch erklären ließ. Dieser Substanz kann daher keine inhibitorische Wirkung bei der Infektion zugeschrieben werden (Abb. 4.21 A).

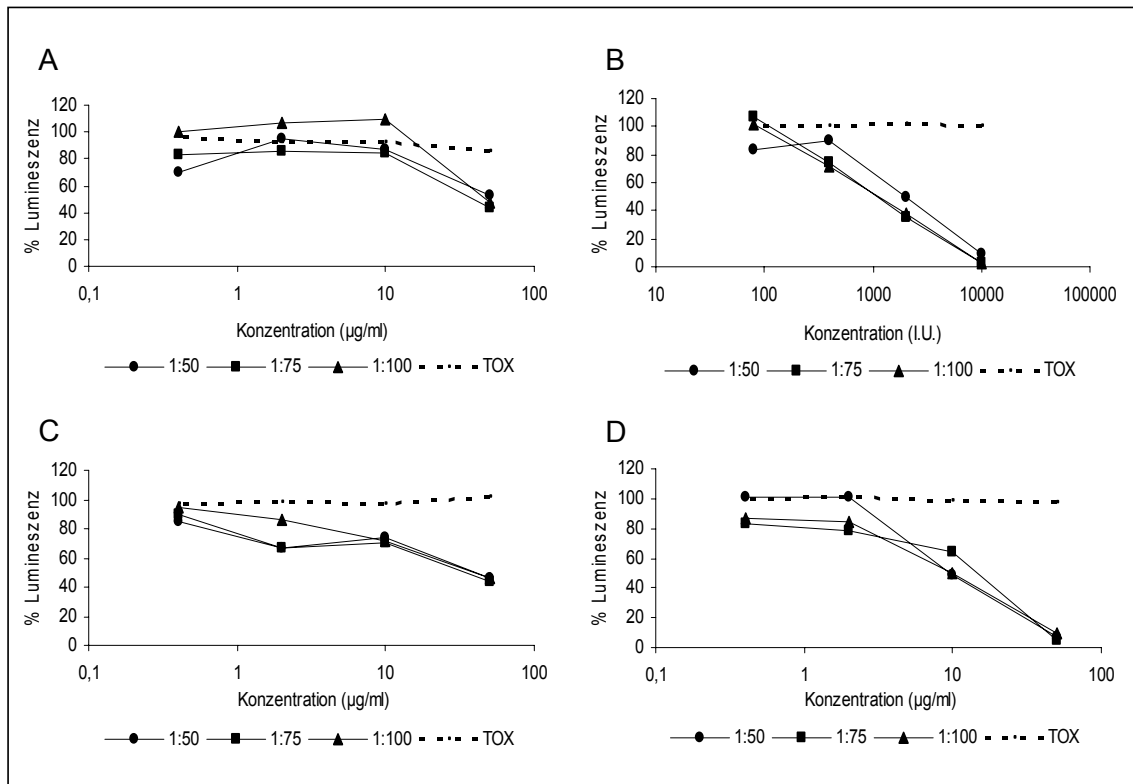


Abb. 4.21: Einfluss von Carbocyclic-3-deaza Adenosin, 3-deaza-Neplanocin A, Interferon und Ribavirin auf die Infektion mit iVLPs.

(A-D) 293-Zellen wurden mit 1 µg 3M-5M luc, 0,5 µg pCAGGS-T7, 1 µg pCAGGS-L, 0,5 µg pCAGGS-NP, 0,1 µg pCAGGS-VP35, 0,1 µg pCAGGS-VP30, 0,07 µg pCAGGS-VP24, 0,5 µg pCAGGS-VP40 und 0,5 µg pCAGGS-GP (Menge pro 9 cm²-Zellkulturmonolayer) transfiziert und die in den Zellkulturüberstand abgegebenen iVLPs durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Verdünnungen von 1:50, 1:75 oder 1:100 der iVLPs wurden mit 50 µg/ml, 10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml oder 0 µg/ml von Carbocyclic-3-deaza Adenosin (A), 3-deaza-Neplanocin A (C) und Ribavirin (D) und 10000 U, 2000 U, 400 U, 80 U oder 0 U Interferon (B) inkubiert und auf HUH7-Zellen gegeben, welche 16 h zuvor mit pCAGGS-L, -NP, -VP35 und -VP30 transfiziert worden waren. Die Zellen wurden für 48 h inkubiert und die Renilla-Reportergenaktivität bestimmt. Parallel wurden HUH7-Zellen mit den Inhibitoren in gleicher Verdünnung inkubiert und nach einer 48-stündigen Inkubation ein Toxizitätstest mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2-H-tetrazolium (MTS) durchgeführt (A-D gestrichelte Linie).

Bei Inkubation mit Interferon ließ sich ein Rückgang der Reportergenaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration feststellen. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10.000 U Interferon fand sich nahezu keine Reportergenaktivität mehr. Die Inhibition lässt sich in diesem Fall auch nicht auf toxische Eigenschaften der Substanz zurückführen. Die hier getesteten Konzentrationen der iVLPs schienen keinen Einfluss auf die Signalstärke zu haben (Abb. 4.21 B).

Bei den Versuchen mit 3-deaza-Neplanocin A und Ribavirin ließ sich ebenfalls ein dosisabhängiger Rückgang der Reporterogenaktivität verzeichnen, wobei die Inhibition mit Ribavirin ausgeprägter war (Abb. 4.21 C und D). Bei Verwendung von 50 µg/ml 3-deaza-Neplanocin A fiel die Reporterogenaktivität bis auf 40% der Aktivität ohne Behandlung ab. Es kann von normaler metabolischer Aktivität der Zellen ausgegangen werden, wie der Toxizitätstest zeigte (Abb. 4.21 C).

Außer bei der geringsten iVLP-Verdünnung (1:50) führte die Inkubation mit Ribavirin bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 0,4 µg/ml, zu einem Abfall der Reporterogenaktivität auf 80%. Gesteigerte Konzentrationen von Ribavirin bis 50 µg/ml führten zum kompletten Rückgang der Reporterogenaktivität. Auch hier war die metabolische Aktivität der Zellen normal (Abb. 4.21 D).

Abschließend konnte in einem größeren Ansatz bereits 350 potentiell antivirale Substanzen getestet werden, von denen sich 12 als primär positiv erwiesen (Daten nicht gezeigt). Deren Wirkung soll nun durch Wiederholung und den Einsatz eines weiteren Konzentrationsspektrums näher bestimmt werden. Zum Ende der Doktorarbeit stehen diese Ergebnisse noch aus.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine dosisabhängige Inhibition der Reporterogenaktivität mit stabilen Signalen möglich ist und sich das System für Tests mit einem hohen Probendurchsatz eignet.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Modellsystem für Marburg Viren erfolgreich etabliert werden. Fragen zur Transkription, Virusmorphogenese, Virusausschleusung und Infektiösität können hierdurch unter Standardlaborbedingungen beantwortet werden. Durch Titrationsanalysen, bei denen die transfizierte Menge eines Expressionsplasmids, bei konstanter Menge der anderen, erhöht wurde, konnte untersucht werden, wie das virale System auf Veränderungen der intrazellulären Konzentration einzelner viraler Proteine reagiert. Dies erlaubte eine nähere Charakterisierung der Funktion dieser Proteine bei der Transkription/ Replikation, Ausschleusung und Infektion. Hier

zeigte sich, dass offenbar gewisse Phasen durchlaufen werden und für die einzelnen Schritte bestimmte Mengen der einzelnen Proteine notwendig sind. Auch die zelluläre Transkription scheint durch einzelne Proteine beeinflusst zu werden. Das etablierte iVLP-System kann zukünftig Verwendung in Testsystemen finden um Analysen mit nativen Viren zu umgehen. Dies zeigten erste Anwendungen in deren Verlauf die iVLP-Infektion durch ein neutralisierendes Serum und antivirale Substanzen dosisabhängig inhibiert wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Peptid aus menschlichem Samen dosisabhängig die Infektiosität der iVLPs steigert.

5 Diskussion

5.1 Etablierung des infektiösen Minigenomsystems für Marburg Virus

Reverse Genetik beschreibt in der molekularen Virologie die artifizielle Herstellung von Viren auf der Grundlage transfizierter cDNA. Das erste System dieser Art wurde für ein positivsträngiges RNA-Virus, das Poliovirus, entwickelt. Die Transfektion der viralen RNA in Säugerzellen führte zur Expression der viralen Proteine und Bildung neuer Viren (Racaniello and Baltimore, 1981).

Schwieriger erschien die Etablierung solcher Systeme für negativsträngige RNA-Viren, deren Genom per se nicht infektiös ist. 1989 gelang es ein solches System für das Influenza A Virus zu entwickeln und ein CAT-Reportergen in negativer Orientierung zwischen nicht-kodierenden viralen 5'- und 3'-Sequenzen in Virionen zu verpacken (Luytjes et al., 1989). Hierbei war man jedoch auf die Anwesenheit eines Helfervirus angewiesen.

Für das Respiratorische Synzytial Virus (RSV) konnte wenig später ein sogenanntes Minigenom kloniert werden. Dieses basierte auf cDNA, welche aus einem CAT-Reportergen zwischen Leader- und Trailer-Sequenzen des Virus bestand. Über einen T7-Promotor wurde ein RNA-Strang erzeugt, welcher, bei gleichzeitiger Infektion mit einem Helfervirus, verpackt wurde. Die erfolgreiche Infektion von Wirtszellen durch diese infektiösen Virus-ähnlichen Partikel (iVLPs) konnten über die Reportergenaktivität nachgewiesen werden (Collins et al., 1991). Die Transfektion von Expressionsplasmiden, welche für alle viralen Proteine kodieren, machte beim Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) erstmals eine Verpackung mittels Helferviren überflüssig (Pattnaik and Wertz, 1991).

Für das MARV wurde ein spezifisches Minigenomsystem beschrieben mit dem es möglich war die Rolle der Nukleokapsidproteine während der viralen Replikation und Transkription zu untersuchen. Grundsätzliche Aspekte der Molekularbiologie des Virus konnten hiermit geklärt werden. So konnte gezeigt werden, dass drei der vier Nukleokapsidproteine (L, NP, VP35) sowohl

notwendig als auch ausreichend für die Transkription und Replikation des MARV sind (Muhlberger et al., 1998).

Eine Erweiterung dieses Minigenomsystems zu einem iVLP-System ist besonders für hochpathogene Viren wie die Filoviren interessant. Mit ihnen ist die Untersuchung vieler Stadien des Replikationszyklus möglich, ohne dass unter höchsten Sicherheitsbedingungen (BSL-4) gearbeitet werden muss. Für Filoviren wurde 2004 die Herstellung von EBOV iVLPs auf der Grundlage von cDNA beschrieben (Watanabe et al., 2004). Ein artifizielles System ermöglichte es seither, durch Transkription und Replikation eines T7-gestützten Minigenoms, funktionelle Untersuchungen auch außerhalb eines Hochsicherheitslabors durchzuführen.

Eine Weiterentwicklung des MARV Minigenomsystems zu einem iVLP-System wurde in dieser Arbeit durch simultane Expression aller viralen Proteine zusammen mit einem Minigenom erreicht. Gebildete Nukleokapsidkomplexe können, vermittelt über VP24 und VP40, aus den Zellen in Form von VLPs freigesetzt werden. Diese sind durch den Einbau des Oberflächenproteins GP in der Lage rezeptorspezifisch an Wirtszellen zu binden und nach rezeptorvermittelter Endozytose die Fusion von Virus- und Wirtsmembran zu vermitteln. Das eingebrachte Minigenom steht nun als Matrize für den Replikations- und Transkriptionskomplex zur Verfügung. Die Aktivität des Reportergens in den Zielzellen ist somit ein Hinweis auf die erfolgreiche Verpackung und Ausschleusung des Minigenoms aus den Zellen und die Infektiosität der iVLPs. Die hier verwendete Renilla-Luziferase als Reportergen ermöglicht dabei die schnelle, sensible und standardisierbare Quantifizierung der viralen Transkription und Replikation.

5.2 Morphologische Charakterisierung der Marburg Virus iVLPs

Die mittels des iVLP-Systems gebildeten Partikel gleichen in der elektronenmikroskopischen Analyse nativen MARV Partikeln.

Als Unterschied fällt die verkürzte Länge der iVLPs auf, welche sich vermutlich auf die Größe des Minigenoms zurückführen lässt, die nur einem Zwanzigstel des viralen Genoms entspricht. Zudem lassen sich im Vergleich zum nativen Virus häufiger Partikel nachweisen die keinen Nukleokapsidkomplex enthalten. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Verpackung und Knospung von iVLPs weniger effektiv ist als von authentischen Viren (Beobachtungen Frau Dr. L. Kolesnikova). Möglicherweise müssen die viralen Proteine während der einzelnen Phasen der Virusmorphogenese in genau definierten Verhältnissen zueinander vorliegen. Dies lässt sich durch unterschiedliche Mengen der Expressionsplasmide bei einer Transfektion nur bedingt nachstellen.

Interessanterweise scheint die Anwesenheit des Minigenoms keinen Einfluss auf die Effizienz der Ausschleusung der iVLPs zu haben. In der Titrationsanalyse des Minigenoms war die Menge detektierter iVLPs konstant, auch wenn kein Minigenom-Plasmid transfiziert wurde (Abb. 4.10 C; nicht gezeigte Daten).

Die gebildeten iVLPs konnten hinsichtlich ihrer Form näher charakterisiert werden. Es fanden sich sphärische und filamentöse Partikel, deren Menge und Infektiosität genauer bestimmt werden konnte (Abb. 4.12). Von den transfizierten Zellen werden in großer Zahl sphärische Partikel gebildet, die vermutlich keinen funktionellen Nukleokapsidkomplex enthalten und nicht infektiös sind. Es konnte gezeigt werden, dass Partikel dieser Art oft zelluläre Proteine enthalten und vermutlich nicht VP40-induziert sind. Filamentöse Partikel hingegen werden spezifisch in Abhängigkeit von VP40 gebildet, was einem Einbau zellulärer Proteine vermutlich entgegenwirkt (Kolesnikova, 2009). Hier konnte gezeigt werden, dass filamentöse Partikel vermutlich der infektiösen Form der Partikel entsprechen, wobei sich qualitative Unterschiede zeigten. Neben Partikeln, welche dem nativem Virus ähnlich erscheinen und oft die typische „9“-förmige Gestalt aufweisen, fanden sich auch sehr lange, weniger infektiöse Partikel. Es scheint daher eine optimale iVLP-Form in Bezug auf Form und Länge zu geben.

5.3 Einfluss verschiedener Mengen der Marburg Virus-Expressionsplasmide auf die verschiedenen Phasen der iVLP-Synthese

5.3.1 Rolle der Polymerase L im iVLP-System

Auswirkungen verschiedener Mengen der transfizierten Expressionsplasmide auf die Reporterogenaktivität wurden von Mühlberger et al. im MARV Minigenomsystem für Nukleokapsidproteine bereits untersucht (Mühlberger et al., 1998). Auch für das iVLP-System beim verwandten EBOV variierte die Reporterogenaktivität und die Partikelausschleusung mit den Mengen der einzelnen Expressionsplasmide (Watanabe et al., 2004). Die detektierte Reporterogenaktivität wird dabei als Maß für die Transkriptionsaktivität angesehen. Es bleibt aber zu berücksichtigen, dass zu einem gewissen Teil auch Replikationsaktivität gemessen wird, da die in der Zelle exprimierte virale Polymerase das Minigenom auch repliziert (Mühlberger et al., 1998). Hierdurch entstehen Matrizen für die Synthese weiterer negativsträngiger Minigenome, die ebenfalls für die Transkription zur Verfügung stehen und so das Transkriptionssignal verstärken.

Am Beispiel der Polymerase konnte gezeigt werden, dass gesteigerte Plasmidmengen von L zu einer Erhöhung des Reporterogensignals in den transfizierten Zellen führten. Im verwandten EBOV iVLP-System wurden Mengen bis 4 µg L-Plasmid getestet und die Reporterogenaktivität stieg in Abhängigkeit von der transfizierten Plasmidmenge (Watanabe et al., 2004). In dem von Mühlberger et al. etablierten Minigenomsystem zeigte sich ein Maximum der Reporterogenaktivität bei Transfektion von 1 µg L-Plasmid, während größere Mengen zu einem Rückgang der Reporterogenaktivität führten (Mühlberger et al., 1999). Dies deckt sich mit Untersuchungen beim VSV, wo sich große Mengen L-Plasmid sowohl bei der Replikation als auch bei der Partikelausschleusung inhibierend auswirkten. Eine optimale Replikation erfolgte, wenn die transfizierte

NP-Plasmidmenge drei- bis fünfmal über der Konzentration des L-Plasmids lag (Pattnaik and Wertz, 1990).

Im hier untersuchten MARV iVLP-System stieg die Reporterogenaktivität in den transfizierten und infizierten Zellen in Abhängigkeit von der transfizierten L-Plasmidmenge zunächst exponentiell an und ging dann in ein Plateau über. Der Effekt auf die infizierten Zellen lässt sich dabei nicht auf eine Erhöhung der iVLP-Menge zurückführen, so dass möglicherweise von einem erhöhten Minigenom- oder L-Einbau in die iVLPs auszugehen ist (Abb. 4.4).

Größere Plasmidmengen bis 10 µg pCAGGS-L führten zu keiner weiteren Steigerung der Reporterogenaktivität in transfizierten Zellen, wirkten sich aber auch nicht negativ aus (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede zu den veröffentlichten Ergebnissen könnten dadurch erklärt werden, dass L durch die iVLPs kontinuierlich aus der Zelle ausgeschleust und ein inhibitorischer Einfluss auf die Reporterogenaktivität so verhindert wird.

5.3.2 Einfluss von VP40 auf virale Transkription und Replikation

Untersuchungen der Matrixproteine vieler Mononegavirales zeigen, dass diese sowohl Funktionen bei der viralen Morphogenese und Ausknospung, als auch bei der viralen Transkription, Translation und Replikation erfüllen.

So ist bekannt, dass das Matrixprotein M des VSV einen inhibitorischen Einfluss auf die virale Transkription in infizierten Zellen hat (Carroll and Wagner, 1979; Clinton et al., 1978). Dem Protein scheint dabei sowohl eine regulatorische Funktion bei der viralen Transkription als auch der Translation zuzukommen. So wird vermutet, dass es zur Aktivierung viraler Translation beiträgt und über die Steigerung der Translationsaktivität eine schnelle Umsetzung von viraler mRNA und Synthese viraler Proteine begünstigt (Connor and Lyles, 2002; Connor et al., 2006).

Eine Inhibition der viralen Transkription ist auch von den Matrixproteinen des Rabies und des Humanen Respiratorischen Synzytial Virus (HRSV) bekannt. Gleichzeitig konnte hier eine Erhöhung der Replikationsrate beobachtet werden,

was zu der Vermutung führte, dass dem Matrixprotein bei der Regulation des Verhältnisses von Transkription und Replikation und damit möglicherweise der zeitlichen Steuerung der Virusvermehrung eine Schlüsselfunktion zukommt (Bermingham and Collins, 1999; Finke et al., 2003). Dies deckt sich nicht mit der Funktion des Masern Virus M-Proteins. Hier betrifft die Inhibition durch das M-Protein sowohl die Transkription als auch die Replikation (Reuter et al., 2006). Beim Sendai Virus, einem anderen Vertreter der Paramyxoviridae, wird generell ein Einfluss des M-Proteins auf diese Prozesse bezweifelt (Mottet-Osman et al., 2007).

Mit Hilfe des iVLP-Systems konnte der Einfluss des MARV Matrixproteins VP40 auf die virale Transkription, gemessen an der Reporterogenaktivität des Minigenoms in den transfizierten Zellen, analysiert werden. Es zeigte sich, dass die Erhöhung der VP40-Plasmidmenge zu einem Rückgang der Reporterogenaktivität in diesen Zellen führte. Größere Mengen an VP40 in der Zelle scheinen also auch bei MARV inhibitorisch auf die virale Transkription zu wirken (Abb. 4.7; 4.13 C und D).

Da nur das replizierte Minigenom spezifisch in iVLPs verpackt wird, wurde die Reporterogenaktivität, die die iVLPs in Zellen der P1-Passage induzieren, als Maß für die Replikation in P0-Passage Zellen herangezogen. Die Menge der verwendeten iVLPs wurde so gewählt, dass alle Zellen der P1-Passage mit der gleichen Menge an VP40 infiziert wurden. Gemessene Unterschiede in der Reporterogenaktivität dieser Zellen sollten somit der Menge an eingebautem Minigenom in den VLPs und damit der Menge an gebildeter genomischer Minigenom RNA äquivalent sein. Es konnte gezeigt werden, dass Partikel, die durch Transfektion einer höheren Konzentration des VP40-Plasmids hergestellt wurden, zu einer geringeren Reporterogenaktivität in infizierten Zellen führten. Große Mengen an VP40 in den Zellen führten demnach zu einer Abnahme des Minigenoms in den iVLPs (Abb. 4.15). Dies spricht für einen inhibitorischen Effekt des VP40 auch auf die virale Replikation.

Anders als beispielsweise beim Rabies Virus kann die Funktion des MARV Matrixproteins nicht in der Regulation des Übergangs von der Transkription zur

Replikation gesehen werden, da beide durch große VP40-Mengen inhibiert werden. Es liegt aber die Vermutung nahe, dass VP40 eine Funktion beim Abschalten sowohl von Transkription als auch Replikation besitzt und möglicherweise den Prozess der Virusmorphogenese einleitet.

5.3.3 Einfluss von VP40 auf die zelluläre Transkription

Neben der Inhibition viraler Transkription wurde den Matrixproteinen der Mononegavirales auch ein Einfluss auf die zelluläre Transkriptionsmaschinerie zugeschrieben. Für das VSV wurde eine Inhibition der Wirtszelltranskription gezeigt (Black and Lyles, 1992; Black et al., 1993). Dieser Effekt scheint durch zwei unabhängige Mechanismen gesteuert zu werden. Zum einen wird die zelluläre Transkription durch die RNA-Polymerasen I, II und III gehemmt (Ahmed and Lyles, 1998). Im Falle der RNA-Polymerase II erfolgt diese Inhibition über das TATA-bindende-Protein (TBP), einer Untereinheit des basalen Transkriptionsfaktors TFIID, wobei dieser Prozess noch nicht gänzlich verstanden ist (Yuan et al., 2001). Zum anderen liegt das M-Protein in infizierten Zellen auch mit den Kernporen assoziiert vor. In dieser Position verhindert es, dass zelluläre RNA vom Kern ins Zytoplasma transportiert und Proteine in den Kern importiert werden (Her et al., 1997; Petersen et al., 2000). Die Tatsache, dass auch das M-Protein des HRSV zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion im Kern lokalisiert ist, weist auf eine ähnliche Funktion hin (Ghildyal et al., 2003). Rekombinant exprimiertes MARV VP40 lässt sich wenige Stunden nach der Transfektion in der perinukleären Umgebung detektieren, bevor eine Akkumulation im späten Endosom erfolgt (Kolesnikova et al., 2004a). Eine Lokalisation des VP40 im Kern der transfizierten Zelle wird in der Immunfluoreszenzanalyse manchmal beobachtet, ist aber formal noch nicht nachgewiesen (Eva Mittler, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss von VP40 auf die zelluläre Transkription gezeigt werden. Ein Firefly-Luziferase-Reportergen wurde unter der

Kontrolle eines Polymerase II-Promoters in Zellen exprimiert und diese gleichzeitig mit unterschiedlichen VP40-Plasmidmengen transfiziert. Die Messung der Reportergenaktivität zeigte einen fünffachen Rückgang der zellulären Transkription bei Transfektion von 1,5 µg pCAGGS-VP40 (Abb. 4.13 A).

Vergleicht man die Auswirkungen des VP40 auf zelluläre und virale Transkription, so fällt die virale Transkription bei Transfektion von 1,5 µg (2 µg) pCAGGS-VP40 auf 20,1% (20,2%) der ursprünglichen Aktivität, die der viralen auf 29,1% (12,6%) (Abb. 4.13). Funktion und Mechanismus der Inhibition der zellulären Transkription durch VP40 ist gegenwärtig nicht verstanden und bedarf weiterer Untersuchungen. Sollte sich herausstellen, dass VP40 ebenfalls wie das VSV M den Kerntransport hemmt, könnte ein Einfluss des Proteins auf die angeborene Immunantwort der Zelle vermutet werden. Ein ähnlicher Mechanismus wird gegenwärtig für das VP24 des EBOV vermutet (Reid et al., 2007).

5.3.4 Einfluss von VP40 auf die iVLP-Menge

VP40 liegt in der Zelle zum einen assoziiert mit den Nukleokapsidkomplexen und zum anderen mit späten Endosomen vor (Kolesnikova et al., 2002). Auch der Transport in der Zelle erfolgt zusammen mit dem Nukleokapsidkomplex oder in membrangebundener Form über den retrograden endosomalen Weg (Kolesnikova et al., 2004a; Kolesnikova et al., 2004b). Es ist ebenfalls bekannt, dass rekombinant exprimiertes VP40 seine eigene Freisetzung in Form von VLPs induzieren kann (Kolesnikova et al., 2004b; Swenson et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transfektion großer Mengen des VP40-Plasmids zu einer gesteigerten Bildung von iVLPs führte (Abb. 4.7). In infizierten Zellen der P1-Passage konnte eine Steigerung der Reportergenaktivität in Abhängigkeit von der transfizierten Plasmidmenge beobachtet werden (Abb. 4.7 D). Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass VP40 in einem späten Schritt des viralen Replikationszyklus die

Transkription und Replikation terminiert und die virale Morphogenese einleitet, die in der Ausschleusung von infektiösen Partikeln gipfelt.

5.3.5 Einfluss der GP-Menge auf die Infektiösität der iVLPs

Membrangebundenes EBOV und MARV GP wird in Virionen eingebaut und vermittelt deren Eintritt in die Wirtszelle durch rezeptorvermittelte Endozytose (Kawaoka, 2005). Inwieweit die Menge an GP die Infektiösität ausgeschleuster Virionen beeinflusst, wurde für die vier Subtypen des EBOV bereits mit einem System untersucht, bei dem die zelluläre Expression von GP induzierbar war (Marzi et al., 2006). GP wurde so in verschiedenen Mengen in pseudotypisierte Viren eingebaut und deren Infektiösität untersucht. Dabei zeigte sich, dass schon eine geringe Menge an GP ausreichen scheint, um die Infektion von Wirtszellen mit großer Effektivität zu ermöglichen. Interessanterweise ließ sich bei EBOV Reston (REBOV) und EBOV Ivory Coast (ICEBOV) mit einer erhöhten Induktion der GP-Expression eine Steigerung der Infektiösität verfolgen, während bei EBOV Zaire (ZEBOV) und EBOV Sudan (SEBOV) das höchste Niveau schon bei geringer Induktion erreicht war (Marzi et al., 2006). Frühe Untersuchungen zum VSV zeigten, dass während der Knospung Partikel mit unterschiedlichen Mengen an eingebautem Oberflächenprotein G entstehen und dass diejenigen mit einer sehr hohen G-Konzentration weniger infektiös sind (Lodish and Porter, 1980).

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die virale Transkription unabhängig von der Menge an intrazellulärem GP war. Die Western Blot Analyse der aus den Zellen ausgeschleusten iVLPs zeigte, dass die Menge an eingebautem GP mit der verstärkten intrazellulären Expression zunahm, während die der anderen Proteine konstant blieb. Dies zeigt, dass nicht die Partikelmenge, sondern die absolute Menge an GP pro Partikel zunahm (Abb. 4.9). Da die Reportergenaktivität in den infizierten Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten GP-Plasmidmenge in den Zellen der P0-Passage anstieg, spricht dies für eine Steigerung der Infektiösität der iVLPs in Abhängigkeit der

Menge an eingebautem GP. Demnach kann über die transfizierte GP-Plasmidmenge die Menge an GP auf der Oberfläche der Partikel und die damit verbundene Infektiosität direkt reguliert werden. Dieser Befund komplementiert die Ergebnisse von Marzi et al., die mit pseudotypisierten Retroviruspartikeln erhalten wurden (Marzi et al., 2006).

5.3.6 Rolle des VP30 im iVLP-System

Es konnte gezeigt werden, dass drei der vier Nukleokapsidproteine für die Transkription und Replikation des MARV Minigenomsystems ausreichend waren; VP30 hingegen schien in diesem System keine Rolle zu spielen (Muhlberger et al., 1998). Die Tatsache, dass in MARV-infizierten Zellen die Reduktion der Expression von VP30 mittels RNA-Interferenz zu einer Reduktion der Expression anderer viraler Proteine und der Virusmenge führte, sprach hingegen für einen Einfluss des VP30 auf die virale Transkription (Fowler et al., 2005). Wird ein auf cDNA basierendes MARV-Genom mit den Nukleokapsidproteinen in Zellen exprimiert, ist für die Bildung neuer Viren die Anwesenheit des VP30 ebenfalls zwingend notwendig (Enterlein et al., 2006).

Beim verwandten EBOV stellt VP30 einen notwendigen Transkriptionsaktivator dar, welcher Sekundärstrukturen der viralen RNA in der Nähe des ersten Transkriptionsstarts bindet (John et al., 2007). Zudem spielt VP30 eine Rolle bei der Reinitiierung der Transkription an den Gengrenzen des EBOV (Martinez et al., 2008).

Hier konnte gezeigt werden, dass VP30 für die Reporterogenaktivität in den transfizierten Zellen zwar nicht essentiell ist, diese aber deutlich erhöht. Ein gleiches Bild bietet sich in infizierten Zellen der P1-Passage. Zunächst steigt die Reporterogenaktivität mit steigenden Mengen an VP30 an und fällt dann wieder auf Werte ab, die auch ohne VP30 erreicht werden. (Abb. 4.6).

Die Western Blot Analyse der iVLPs zeigt eine Zunahme viraler Proteine, nachgewiesen durch NP, in Abhängigkeit von der transfizierten Menge an VP30-Plasmid (Abb. 4.6 C). Dies spricht für eine gesteigerte iVLPs-Ausschleusung,

was andeutet, dass VP30 die Ausschleusung von Partikeln beeinflusst. Dieser Effekt wurde für VP30 bislang noch nicht beschrieben und muss noch genauer untersucht werden.

5.3.7 Rolle des VP24 im iVLP-System

VP24, das zweite Matrixprotein der Filoviren, ist zwischen Nukleokapsid und Virusmembran lokalisiert und seine Rolle ist bisher noch weitestgehend unverstanden (Elliott et al., 1985). Wird die Expression von VP24 in MARV infizierten Zellen mittels RNA-Interferenz herunterreguliert, nimmt die Menge ausgeschleuster Virionen signifikant ab (Bamberg et al., 2005).

Hier konnte gezeigt werden, dass die Transfektion großer VP24-Plasmidmengen zur Inhibition der viralen Transkription führt, während gleichzeitig die zelluläre Transkription verstärkt wird (Abb. 4.8; 4.14 A). Beim verwandten EBOV konnte der Effekt auf die virale Transkription ebenfalls nachgewiesen werden (Watanabe et al., 2007). Die Synthese effektiver Mengen an VP24 erfolgt durch die Lage des VP24 Gens auf dem Genom später als die Synthese von NP, VP35 und VP40 (Elliott et al., 1985). Möglicherweise ist dadurch die Aktivität von VP24 reguliert, das verantwortlich sein könnte, den Nukleokapsidkomplex von der transkriptionsaktiven Form hin zu einer verpackungskompetenten Form zu modifizieren (Huang et al., 2002).

In der durchgeführten Western Blot Analyse war allerdings die Konzentration nachgewiesenem NP als Marker für die Menge ausgeschleuster Partikel in allen Ansätzen nahezu gleich, was darauf schließen lässt, dass VP24, im Gegensatz zu seiner Rolle in MARV-infizierten Zellen, keine Funktion bei der Ausschleußung der iVLPs besitzt (Abb. 4.8 C). Dass VP24 aber eine Rolle bei der Funktionalität der Nukleokapside spielen könnte, wurde für das EBOV VP24 gezeigt. Die Infektion mit VP24-defizienten iVLPs führte zu reduzierten Reportergergenaktivitäten in Zielzellen – wenn diese Zellen nicht mit pCAGGS-L, -NP, -VP35, -VP30 vortransfiziert worden waren (Hoenen et al., 2006). Beim dem hier verwendeten System kann diese Funktion nicht untersucht werden, da die

Transfektion der Zielzellen mit den Nukleokapsidkomponenten für ein detektierbares Signal zwingend notwendig ist.

5.3.8 Rolle von VP35 und NP im iVLP-System

VP35 stellt als Kofaktor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase einen entscheidenden Faktor für die Replikation und Transkription des MARV dar (Muhlberger et al., 1998). Trotz seines geringen Phosphorylierungsgrades wird es als Analogon zu dem Phosphoprotein anderer Mononegavirales angesehen (Becker and Muhlberger, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von VP35 mittels RNA-Interferenz zu einem Rückgang der Menge ausgeschleuster Partikel führte. Das Expressionslevel anderer viraler Proteine schien aber hierdurch nicht beeinträchtigt zu sein (Fowler et al., 2005). In dem von Muhlberger et al. etablierten Minigenomsystem erwies sich die Reportergenaktivität als abhängig vom stöchiometrischen Verhältnis der Menge transfizierter VP35- und NP-Expressionsplasmide, welches im optimalen Fall 1:5 betrug (Muhlberger et al., 1998). Auch bei anderen Mononegavirales, wie beispielsweise RSV, scheint sich das Verhältnis des Phosphoproteins zu NP auf die Transkription auszuwirken (Grosfeld et al., 1995).

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten iVLP-System werden pCAGGS-Vektoren verwendet, deren enthaltene Gene unter der Kontrolle eines Polymerase II-Promotors stehen. Das eingesetzte Verhältnis von VP35 zu NP beträgt auch hier 1:5, wobei für VP35 eine optimale Menge festgestellt werden konnte. Abweichungen hiervon führten zu einer drastischen Inhibition der Reportergenaktivität in den transfizierten (P0-Passage) und infizierten Zellen (P1-Passage). Die Abhängigkeit der Reportergenaktivität von der VP35-Plasmidmenge war wesentlich ausgeprägter als bei allen anderen getesteten Expressionsplasmiden (Abb. 4.5). In transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Reportergenaktivität nicht vom stöchiometrischen Verhältnis des VP35 zu den anderen Nukleokapsidproteinen abhängt. Eine Erhöhung der Plasmidmengen von VP35 und L, NP oder VP30 bei gleichen Verhältnissen

zueinander zeigte die gleiche Transkriptionsinhibition, so dass die absolute Menge an VP35 als kritischer Faktor angesehen wird (eigene nicht gezeigte Versuche). Wie schon von Fowler et al. beobachtet, konnte in der Western Blot Analyse bestätigt werden, dass die Menge der ausgeschleusten Partikel im Verhältnis zu der Menge an VP35 in der Zelle steht (Abb. 4.5 A und C).

Werden jedoch große Mengen an VP35- oder NP-Plasmid transfiziert, induzieren die ausgeschleusten iVLPs in infizierten Zellen weniger Reporterogenaktivität (Abb. 4.3 D; 4.5 D). Für NP konnte dabei gezeigt werden, dass bei maximaler Transkription in Zellen der P0-Passage schon ein Rückgang der Reporterogenaktivität in den infizierten Zellen erfolgt. Möglicherweise haben große Mengen VP35 oder NP in den iVLPs einen Einfluss auf Nukleokapsidfunktion. Eine Funktion des VP35 bei der Verpackung konnte für EBOV iVLPs gezeigt werden, da VP35 und VP40 ausreichend für die Verpackung des Minigenoms waren (Johnson et al., 2006b).

Durch die Titrationsanalysen konnte gezeigt werden, wie das iVLP-System auf Veränderungen der intrazellulären Konzentration einzelner Proteine reagiert. Dabei konnten Auswirkungen auf die Transkription/ Replikation, Partikelausschleusung und Infektiosität beobachtet werden. Zusammenfassend scheint die Festlegung auf eine optimale Menge der einzelnen Komponenten äußerst schwierig. So konnte am Beispiel des VP40 gezeigt werden, dass große Proteinmengen in der Zelle zwar Transkription und Replikation inhibieren, jedoch einen positiven Effekt auf die Ausschleusung haben. Als Fazit kann daraus gezogen werden, dass das MARV während seines Vermehrungszyklus bestimmte Phasen durchläuft und für die einzelnen Schritte bestimmte Mengen der einzelnen Proteine notwendig sind. Auch scheint der Übergang dieser Phasen über diese Mengenverhältnisse reguliert zu sein. Erste Vergleiche mit nativem Virus konnten im Western Blot gezeigt werden. Hierbei entsprachen sich die Proteinverhältnisse im Virus und iVLP in etwa für VP35, NP, und GP (Abb. 4.11). Eine genauere Analyse dieser Verhältnisse während der verschiedenen

Replikationsphasen in der virus-infizierten Zelle muss zukünftig durchgeführt werden.

5.4 Anwendungsmöglichkeiten des iVLP-Systems

Um den Einfluss von Substanzen wie beispielsweise chemischen Verbindungen oder Antikörpern auf die filovirale Infektion zu untersuchen, ist man auf Arbeiten in einem Sicherheitslabor der Stufe 4 angewiesen. Die Durchführung dieser Analysen ist äußerst aufwendig und Tests mit einem hohen Durchsatz an Proben praktisch unmöglich. Als Alternative bietet sich das iVLP-System an, das viele Schritte des MARV-Replikationszyklus nachstellt, aber unter S1-Bedingungen durchgeführt werden kann. Auswirkungen auf die Virusvermehrung und Infektion lassen sich dabei schnell und einfach über die Reportergenaktivität erfassen. Da dosisabhängige Inhibitionen der Reportergenaktivität mit stabilen Signalen bestimmt werden können, scheint sich das iVLP-System für Analysen dieser Art zu eignen.

5.4.1 Einfluss von Peptiden aus humanem Samen auf die Infektion mit iVLPs

Ein Proteinabschnitt der aus Sperma isolierten sauren Prostata-Phosphatase (PAP aa 248-286) führte bei Inkubation mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) zu einer verstärkten Infektion von Zielzellen. Der Proteinabschnitt wurde als „Semen-derived Enhancer of Virus Infection“ (SEVI) bezeichnet und bildet in Lösung Fibrillen aus, die für diese Verstärkung verantwortlich zu sein scheinen (Munch et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Infektion von MARV und EBOV iVLPs durch Anwesenheit dieses Proteinabschnittes zu erhöhen. Bei Anwesenheit von 50 ng/mL SEVI war es möglich, die Infektiösität von EBOV iVLPs um das 36-fache zu steigern. Für MARV iVLPs ließ sich eine 7-fache Steigerung nachweisen. Die für HIV beschriebene Steigerung der

Infektiösität gerade bei geringen Virus-Dosen zeigte sich auch bei den durchgeführten Infektionsversuchen mit den iVLPs. Bei allen getesteten iVLP-Verdünnungen war der Einfluss auf die Infektion bei höherer Verdünnung ausgeprägter (Abb. 4.18 A, B und C, D). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Anwesenheit von SEVI die Infektion spezifisch erhöht, da iVLPs ohne GP auf der Oberfläche auch unter SEVI-Einfluss nicht zu einem Reportersignal in Zielzellen führten (Abb. 4.19). Erste Versuche mit MARV bestätigten diesen Effekt auf die filovirale Infektion (Thomas Strecker, persönliche Mitteilung).

Der Nachweis, dass auch Sperma zur Verstärkung einer filoviralen Infektion führt, bestätigte den für SEVI beschriebenen Effekt (Abb. 4.18). Da Filoviren bei einer Infektion auch im Sperma nachweisbar sind, weist dies auf eine mögliche sexuelle Übertragung hin (Simpson, 1977). Diese wurde zwar beschrieben, doch da die Inkubationszeit bei Infektionen mit Filoviren, anders als beispielsweise bei HIV, nur wenige Tage beträgt, scheint sie unter natürlichen Umständen eine untergeordnete Rolle zu spielen (Martini and Schmidt, 1968).

5.4.2 Das iVLP-System als Testsystem für neutralisierende Seren und antivirale Substanzen

Neutralisierende Antikörper verhindern durch Bindung der Oberflächenproteine des Virus dessen Zelladsorption oder blockieren andere wichtige Funktionen wie Konformationsänderungen oder Fusionsaktivität. Um diese neutralisierende Eigenschaft zu testen und zu quantifizieren, wird eine Verdünnungsreihe des Antikörpers oder Serums mit einer bekannten Virusmenge gemischt und mit Zellen, die für das Virus empfänglich sind, inkubiert. Ist eine neutralisierende Wirkung vorhanden, bleiben die Zellen bis zu einer bestimmten Verdünnungsstufe des Antikörpers oder Serums vor der Infektion geschützt. Diese Analyse ist bei Filoviren sehr erschwert, da man auf ein Sicherheitslabor der Stufe 4 angewiesen ist.

Das gleiche Problem stellt sich beim Test antiviraler Substanzen. Im vorliegenden Fall wurden chemisch hergestellte Verbindungen, die sich bei

anderen Virussystemen als antiviral erwiesen hatten, durch Modifikation einzelner chemischer Gruppen verändert und so eine sehr große Anzahl potentiell antiviraler Substanzen generiert. Da erfahrungsgemäß nur etwa jede tausendste Verbindung einerseits eine antivirale Wirkung aufweist und andererseits nicht zytotoxisch ist, ist eine lohnende Analyse nur bei einem Hochdurchsatz von Proben sinnvoll. Auch hier erweisen sich Arbeiten an Filoviren aufgrund der hohen Sicherheitsanforderungen als schwierig. Als Alternative bietet sich das iVLP-System an, das viele Schritte des MARV Replikationszyklus nachstellt, aber unter S1-Bedingungen durchgeführt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Analysesystem entwickelt werden, mit dem Untersuchungen von potentiellen antiviralen Substanzen und neutralisierenden Antikörpern durchgeführt werden können. Um einen hohen Durchsatz an Proben zu gewährleisten, wurde das 96-Lochplatten-Format gewählt. Die zu infizierenden Zellen wurden nach der Transfektion in diesen Platten kultiviert, um die abschließende Detektion der Reporter-genaktivität einfach und schnell erfolgen zu lassen. Um die eingesetzte iVLP-Menge zu standardisieren, wurde die minimale infektiöse Dosis vor jedem Versuchsansatz ermittelt (Abb. 4.16).

Für ein anti-MARV Serum (generiert in Ziegen) konnte mit steigender Konzentration nach Inkubation mit den iVLPs ein Rückgang der Reporter-genaktivität in infizierten Zellen beobachtet werden. Diese dosisabhängige Hemmung der GP-vermittelten Adsorption und Infektion der Zellen durch iVLPs entspricht der Erwartung für ein neutralisierendes Serum (Abb. 4.17).

Um diese Versuchsanordnung für die Analyse antiviraler Substanzen im hohen Durchsatz zu testen, wurden zunächst Versuche mit Referenzkomponenten durchgeführt, von denen eine antivirale Wirkung bekannt war. Dabei zeigte sich nahezu kein bzw. nur ein schwacher Einfluss der beiden S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase Inhibitoren Carbocyclic-3-deaza-Adenosin und 3-deaza-Neplanocin A auf die Infektiosität der iVLPs. Für Ribavirin und Interferon war

hingegen eine sehr ausgeprägte Inhibition der Infektion zu verzeichnen (Abb. 4.21).

In der Literatur wurde eine inhibitorische Wirkung der hier getesteten S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase Inhibitoren auf die Infektion mit nativen Filoviren beschrieben (Huggins et al., 1999). Warum diese Substanzen hier nur eine schwache bzw. gar keine Wirkung zeigten, lässt sich eventuell auf Unterschiede in der Sensitivität der beiden Tests zurückführen.

Von dem die iVLP-Infektion hemmenden Interferon α ist bekannt, dass rekombinantes Interferon α im Affenmodel die Virämie und den Tod der Tiere nach Infektion mit EBOV oder MARV um einige Tage verzögert (Jahrling et al., 1999; Kolokol'tsov et al., 2001). Neuere Ergebnisse zeigen den protektiven Effekt bestimmter Interferon α Präparationen (Lisa Hensley, Filovirus Meeting Gabon). Ribavirin zeigte im zellbasierten MARV iVLP-System eine starke inhibitorische Wirkung; für eine Infektion mit nativen Viren hingegen konnte ein entsprechender Effekt nicht gezeigt werden, wobei aufgrund fehlender Versuchsbeschreibungen in der Literatur ein Vergleich leider nicht möglich ist (Huggins, 1989).

Zusammenfassend konnte bei dem verwendeten Serum und einigen der getesteten Referenzkomponenten ein dosisabhängiger Rückgang der Reporter-genaktivität beobachtet werden, was auf eine Inhibition der Infektion schließen lässt. Ein Vergleich des Einflusses dieser Inhibitoren mit nativem Virus steht zurzeit noch aus. Ebenso bestätigen erste Screens mit 350 potentiell antiviralen Substanzen die Anwendbarkeit der iVLPs als Testsystem.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass sich das entwickelte iVLP-System für MARV zum Hochdurchsatz-Screening für antivirale Substanzen eignet.

6 Zusammenfassung:

Marburg Virus gehört taxonomisch mit dem Ebola Virus zur Familie der *Filoviridae*. Diese Erreger verursachen eine fieberhafte hämorrhagische Erkrankung bei Menschen und nichtmenschlichen Primaten, die mit hohen Letalitätsraten einhergeht. Arbeiten mit diesen Viren lassen sich nur unter der höchsten Sicherheitsstufe BSL-4 durchführen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem für Marburg Viren etabliert um Fragen zur Transkription, Virusmorphogenese, Virusausschleusung und Infektiösität unter Standardlaborbedingungen beantworten zu können. Hierzu wurden Expressionsplasmide, die für alle viralen Proteine kodieren, in Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde ein sogenanntes Minigenom verwendet, welches sich aus viralen nichttranskribierten Sequenzen der Genomenden und einem Luziferase-Reportergen zusammensetzt. Die in der Zelle synthetisierten viralen Nukleokapsidproteine verpacken das Minigenom in Nukleokapside. Die Nukleokapside werden an der Plasmamembran umhüllt und mit Hilfe des Matrixproteins VP40 aus den transfizierten Zellen als infektiöse Virus-ähnliche Partikel (iVLP) ausgeschleust. Aus dem Überstand wurden die iVLPs aufgereinigt und zur Infektion von Zielzellen verwendet. Eine erfolgreiche Infektion konnte durch das verwendete Reportergen schnell, sensitiv und standardisierbar nachgewiesen werden.

Durch Titrationsanalysen, bei denen die transfizierte Menge eines Expressionsplasmids, bei konstanter Menge der anderen, erhöht wurde, konnte untersucht werden, wie das virale System auf Veränderungen der intrazellulären Konzentration einzelner viraler Proteine reagiert. Dies erlaubt eine nähere Charakterisierung der Funktion dieser Proteine bei der Transkription/ Replikation, Ausschleusung und Infektion. Bei dem Matrixprotein VP40 im speziellen legten die Ergebnisse eine regulatorische Funktion für die virale Transkription, Replikation und Virusausschleusung nahe.

Das etablierte iVLP-System kann zukünftig Verwendung in Testsystemen finden um Analysen mit nativen Viren zu umgehen. Dies zeigten erste Anwendungen in deren Verlauf die iVLP-Infektion durch ein neutralisierendes Serum und antivirale Substanzen dosisabhängig inhibiert wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Peptid aus menschlichem Samen dosisabhängig die Infektiösität der iVLPs steigert. Während dieser Versuche wurde auch deutlich, dass sich das iVLP-System als Hochdurchsatzsystem eignet.

7 Literaturverzeichnis:

Ahmed, M., and Lyles, D.S. (1998). Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *Journal of virology* 72, 8413-8419.

Alazard-Dany, N., Ottmann Terrangle, M., and Volchkov, V. (2006). [Ebola and Marburg viruses: the humans strike back]. *Med Sci (Paris)* 22, 405-410.

Arthur, R.R. (2002). Ebola in Africa--discoveries in the past decade. *Euro Surveill* 7, 33-36.

Ascenzi, P., Bocedi, A., Heptonstall, J., Capobianchi, M.R., Di Caro, A., Mastrangelo, E., Bolognesi, M., and Ippolito, G. (2008). Ebolavirus and Marburgvirus: insight the Filoviridae family. *Mol Aspects Med* 29, 151-185.

Baize, S., Marianneau, P., Georges-Courbot, M.C., and Deubel, V. (2001). Recent advances in vaccines against viral haemorrhagic fevers. *Curr Opin Infect Dis* 14, 513-518.

Bamberg, S., Kolesnikova, L., Moller, P., Klenk, H.D., and Becker, S. (2005). VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles. *Journal of virology* 79, 13421-13433.

Basler, C.F., Mikulasova, A., Martinez-Sobrido, L., Paragas, J., Muhlberger, E., Bray, M., Klenk, H.D., Palese, P., and Garcia-Sastre, A. (2003). The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *Journal of virology* 77, 7945-7956.

Basler, C.F., Wang, X., Muhlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H.D., Garcia-Sastre, A., and Palese, P. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12289-12294.

Becker, S., Feldmann, H., Will, C., and Slenczka, W. (1992). Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? *Med Microbiol Immunol* 181, 43-55.

Becker, S., Huppertz, S., Klenk, H.D., and Feldmann, H. (1994). The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. *J Gen Virol* 75 (Pt 4), 809-818.

Becker, S., and Muhlberger, E. (1999). Co- and posttranslational modifications and functions of Marburg virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 23-34.

Becker, S., Rinne, C., Hofsass, U., Klenk, H.D., and Muhlberger, E. (1998). Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* 249, 406-417.

Becker, S., Spiess, M., and Klenk, H.D. (1995). The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 2), 393-399.

Bermingham, A., and Collins, P.L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11259-11264.

Bertherat, E., Talarmin, A., and Zeller, H. (1999). [Democratic Republic of the Congo: between civil war and the Marburg virus. International Committee of Technical and Scientific Coordination of the Durba Epidemic]. *Med Trop (Mars)* 59, 201-204.

Black, B.L., and Lyles, D.S. (1992). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo. *Journal of virology* 66, 4058-4064.

Black, B.L., Rhodes, R.B., McKenzie, M., and Lyles, D.S. (1993). The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *Journal of virology* 67, 4814-4821.

Bourhis, J.M., Johansson, K., Receveur-Brechot, V., Oldfield, C.J., Dunker, K.A., Canard, B., and Longhi, S. (2004). The C-terminal domain of measles virus nucleoprotein belongs to the class of intrinsically disordered proteins that fold upon binding to their physiological partner. *Virus Res* 99, 157-167.

Bray, M., and Paragas, J. (2002). Experimental therapy of filovirus infections. *Antiviral Res* 54, 1-17.

Bray, M., and Pilch, R. (2006). Filoviruses: recent advances and future challenges. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4, 917-921.

Bukreyev, A., Yang, L., Zaki, S.R., Shieh, W.J., Rollin, P.E., Murphy, B.R., Collins, P.L., and Sanchez, A. (2006). A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *Journal of virology* 80, 2267-2279.

Cardenas, W.B., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Hartman, A.L., Kimberlin, C.R., Martinez-Sobrido, L., Saphire, E.O., and Basler, C.F. (2006). Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *Journal of virology* 80, 5168-5178.

Carroll, A.R., and Wagner, R.R. (1979). Role of the membrane (M) protein in endogenous inhibition of in vitro transcription by vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* 29, 134-142.

CDC (1995). Outbreak of Ebola viral hemorrhagic fever--Zaire, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 44, 381-382.

CDC,
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/marburg/marburgtable.htm>
/ <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/ebola/ebolatable.htm>

Chan, S.Y., Empig, C.J., Welte, F.J., Speck, R.F., Schmaljohn, A., Kreisberg, J.F., and Goldsmith, M.A. (2001). Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* 106, 117-126.

Clinton, G.M., Little, S.P., Hagen, F.S., and Huang, A.S. (1978). The matrix (M) protein of vesicular stomatitis virus regulates transcription. *Cell* 15, 1455-1462.

Collins, P.L., Mink, M.A., and Stec, D.S. (1991). Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9663-9667.

Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *Journal of virology* 76, 10177-10187.

Connor, J.H., McKenzie, M.O., and Lyles, D.S. (2006). Role of residues 121 to 124 of vesicular stomatitis virus matrix protein in virus assembly and virus-host interaction. *Journal of virology* 80, 3701-3711.

Dolnik, O., Kolesnikova, L., and Becker, S. (2008). Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cell Mol Life Sci* 65, 756-776.

Elliott, L.H., Kiley, M.P., and McCormick, J.B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* 147, 169-176.

Empig, C.J., and Goldsmith, M.A. (2002). Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *Journal of virology* 76, 5266-5270.

Enterlein, S., Volchkov, V., Weik, M., Kolesnikova, L., Volchkova, V., Klenk, H.D., and Muhlberger, E. (2006). Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30. *Journal of virology* 80, 1038-1043.

Falzarano, D., Krokhin, O., Wahl-Jensen, V., Seebach, J., Wolf, K., Schnittler, H.J., and Feldmann, H. (2006). Structure-function analysis of the soluble glycoprotein, sGP, of Ebola virus. *Chembiochem* 7, 1605-1611.

Feldmann, H., Bugany, H., Mahner, F., Klenk, H.D., Drenckhahn, D., and Schnittler, H.J. (1996). Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *Journal of virology* 70, 2208-2214.

Feldmann, H., and Kiley, M.P. (1999). Classification, structure, and replication of filoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 1-21.

Feldmann, H., Klenk, H.D., and Sanchez, A. (1993). Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch Virol Suppl* 7, 81-100.

Feldmann, H., Muhlberger, E., Randolph, A., Will, C., Kiley, M.P., Sanchez, A., and Klenk, H.D. (1992). Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res* 24, 1-19.

Feldmann, H., Will, C., Schikore, M., Slenczka, W., and Klenk, H.D. (1991). Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology* 182, 353-356.

Feng, Z., Cervený, M., Yan, Z., and He, B. (2007). The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Journal of virology* 81, 182-192.

Finke, S., Mueller-Waldeck, R., and Conzelmann, K.K. (2003). Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J Gen Virol* 84, 1613-1621.

Fisher-Hoch, S.P., and McCormick, J.B. (1999). Experimental filovirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 117-143.

Formenty, P., Hatz, C., Le Guenno, B., Stoll, A., Rogenmoser, P., and Widmer, A. (1999). Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S48-53.

Fowler, T., Bamberg, S., Moller, P., Klenk, H.D., Meyer, T.F., Becker, S., and Rudel, T. (2005). Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. *J Gen Virol* 86, 1181-1188.

Funke, C., Becker, S., Dartsch, H., Klenk, H.D., and Muhlberger, E. (1995). Acylation of the Marburg virus glycoprotein. *Virology* 208, 289-297.

Gale, M., Jr., Blakely, C.M., Kwieciszewski, B., Tan, S.L., Dossett, M., Tang, N.M., Korth, M.J., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18, 5208-5218.

Galinski, M.S., Wechsler, S.L. (1991). The molecular biology of the paramyxovirus genus. "The Paramyxoviruses" Plenum Press, New York, NY, 41-82.

Gear, J.S., Cassel, G.A., Gear, A.J., Trappler, B., Clausen, L., Meyers, A.M., Kew, M.C., Bothwell, T.H., Sher, R., Miller, G.B., *et al.* (1975). Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br Med J* 4, 489-493.

Geisbert, T.W., and Hensley, L.E. (2004). Ebola virus: new insights into disease aetiopathology and possible therapeutic interventions. *Expert Rev Mol Med* 6, 1-24.

Geisbert, T.W., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Larsen, T., Geisbert, J.B., Paragas, J., Young, H.A., Fredeking, T.M., Rote, W.E., and Vlasuk, G.P. (2003). Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet* 362, 1953-1958.

Geisbert, T.W., and Jahrling, P.B. (1995). Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* 39, 129-150.

Geisbert, T.W., Pushko, P., Anderson, K., Smith, J., Davis, K.J., and Jahrling, P.B. (2002). Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg Infect Dis* 8, 503-507.

Geyer, H., Will, C., Feldmann, H., Klenk, H.D., and Geyer, R. (1992). Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. *Glycobiology* 2, 299-312.

Ghildyal, R., Baulch-Brown, C., Mills, J., and Meanger, J. (2003). The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription. *Arch Virol* 148, 1419-1429.

Gomis-Ruth, F.X., Dessen, A., Timmins, J., Bracher, A., Kolesnikowa, L., Becker, S., Klenk, H.D., and Weissenhorn, W. (2003). The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties. *Structure* 11, 423-433.

Gramberg, T., Hofmann, H., Moller, P., Lalor, P.F., Marzi, A., Geier, M., Krumbiegel, M., Winkler, T., Kirchhoff, F., Adams, D.H., *et al.* (2005). LSECTin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology* 340, 224-236.

Grosfeld, H., Hill, M.G., and Collins, P.L. (1995). RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *Journal of virology* 69, 5677-5686.

Hartlieb, B., and Weissenhorn, W. (2006). Filovirus assembly and budding. *Virology* 344, 64-70.

Hartman, A.L., Bird, B.H., Towner, J.S., Antoniadou, Z.A., Zaki, S.R., and Nichol, S.T. (2008). Inhibition of IRF-3 activation by VP35 is critical for the high level of virulence of ebola virus. *Journal of virology* 82, 2699-2704.

Harty, R.N., Paragas, J., Sudol, M., and Palese, P. (1999). A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *Journal of virology* 73, 2921-2929.

Her, L.S., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (1997). Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* 276, 1845-1848.

Hevey, M., Negley, D., Pushko, P., Smith, J., and Schmaljohn, A. (1998). Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology* 251, 28-37.

Hevey, M., Negley, D., VanderZanden, L., Tammariello, R.F., Geisbert, J., Schmaljohn, C., Smith, J.F., Jahrling, P.B., and Schmaljohn, A.L. (2001). Marburg virus vaccines: comparing classical and new approaches. *Vaccine* 20, 586-593.

- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R.K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research* 16, 7351-7367.
- Hoenen, T., Groseth, A., Kolesnikova, L., Theriault, S., Ebihara, H., Hartlieb, B., Bamberg, S., Feldmann, H., Stroher, U., and Becker, S. (2006). Infection of naive target cells with virus-like particles: implications for the function of ebola virus VP24. *Journal of virology* 80, 7260-7264.
- Hoenen, T., Volchkov, V., Kolesnikova, L., Mittler, E., Timmins, J., Ottmann, M., Reynard, O., Becker, S., and Weissenhorn, W. (2005). VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. *Journal of virology* 79, 1898-1905.
- Huang, Y., Xu, L., Sun, Y., and Nabel, G.J. (2002). The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol Cell* 10, 307-316.
- Huggins, J., Zhang, Z.X., and Bray, M. (1999). Antiviral drug therapy of filovirus infections: S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S240-247.
- Huggins, J.W. (1989). Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 4, S750-761.
- Hughes, J.H., Mann, D.R., and Hamparian, V.V. (1986). Viral isolation versus immune staining of infected cell cultures for the laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Clin Microbiol* 24, 487-489.
- Ito, H., Watanabe, S., Takada, A., and Kawaoka, Y. (2001). Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *Journal of virology* 75, 1576-1580.
- Jaax, N., Jahrling, P., Geisbert, T., Geisbert, J., Steele, K., McKee, K., Nagley, D., Johnson, E., Jaax, G., and Peters, C. (1995). Transmission of Ebola virus (Zaire strain) to uninfected control monkeys in a biocontainment laboratory. *Lancet* 346, 1669-1671.
- Jahrling, P.B., Geisbert, T.W., Dalgard, D.W., Johnson, E.D., Ksiazek, T.G., Hall, W.C., and Peters, C.J. (1990). Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* 335, 502-505.
- Jahrling, P.B., Geisbert, T.W., Geisbert, J.B., Swearengen, J.R., Bray, M., Jaax, N.K., Huggins, J.W., LeDuc, J.W., and Peters, C.J. (1999). Evaluation of immune globulin and recombinant interferon-alpha2b for treatment of experimental Ebola virus infections. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S224-234.
- Jasenosky, L.D., and Kawaoka, Y. (2004). Filovirus budding. *Virus Res* 106, 181-188.

John, S.P., Wang, T., Steffen, S., Longhi, S., Schmaljohn, C.S., and Jonsson, C.B. (2007). Ebola virus VP30 is an RNA binding protein. *Journal of virology* 81, 8967-8976.

Johnson, E., Jaax, N., White, J., and Jahrling, P. (1995). Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int J Exp Pathol* 76, 227-236.

Johnson, E.D., Johnson, B.K., Silverstein, D., Tukei, P., Geisbert, T.W., Sanchez, A.N., and Jahrling, P.B. (1996). Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya. *Arch Virol Suppl* 11, 101-114.

Johnson, K.M., Lange, J.V., Webb, P.A., and Murphy, F.A. (1977). Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* 1, 569-571.

Johnson, R.F., Bell, P., and Harty, R.N. (2006a). Effect of Ebola virus proteins GP, NP and VP35 on VP40 VLP morphology. *Viol J* 3, 31.

Johnson, R.F., McCarthy, S.E., Godlewski, P.J., and Harty, R.N. (2006b). Ebola virus VP35-VP40 interaction is sufficient for packaging 3E-5E minigenome RNA into virus-like particles. *Journal of virology* 80, 5135-5144.

Jones, S.M., Feldmann, H., Stroher, U., Geisbert, J.B., Fernando, L., Grolla, A., Klenk, H.D., Sullivan, N.J., Volchkov, V.E., Fritz, E.A., *et al.* (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* 11, 786-790.

Kawaoka, Y. (2005). How Ebola virus infects cells. *N Engl J Med* 352, 2645-2646.

Khan, A.S., Tshioko, F.K., Heymann, D.L., Le Guenno, B., Nabeth, P., Kerstiens, B., Fleerackers, Y., Kilmarx, P.H., Rodier, G.R., Nkuku, O., *et al.* (1999). The reemergence of Ebola hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S76-86.

Kiley, M.P., Bowen, E.T., Eddy, G.A., Isaacson, M., Johnson, K.M., McCormick, J.B., Murphy, F.A., Pattyn, S.R., Peters, D., Prozesky, O.W., *et al.* (1982). Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology* 18, 24-32.

Kiley, M.P., Cox, N.J., Elliott, L.H., Sanchez, A., DeFries, R., Buchmeier, M.J., Richman, D.D., and McCormick, J.B. (1988). Physicochemical properties of Marburg virus: evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus. *J Gen Virol* 69 (Pt 8), 1957-1967.

Kolesnikova, L., Bamberg, S., Berghofer, B., and Becker, S. (2004a). The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway. *Journal of virology* 78, 2382-2393.

Kolesnikova, L., Berghofer, B., Bamberg, S., and Becker, S. (2004b). Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *Journal of virology* 78, 12277-12287.

Kolesnikova, L., Bugany, H., Klenk, H.D., and Becker, S. (2002). VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *Journal of virology* 76, 1825-1838.

Kolesnikova, L., Muhlberger, E., Ryabchikova, E., and Becker, S. (2000). Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *Journal of virology* 74, 3899-3904.

Kolesnikova, L., Strecker, T., Morita, E., Zielecki, F., Mittler, E., Crump, C., and Becker, S. (2009). Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus (akzeptiert).

Kolokol'tsov, A.A., Davidovich, I.A., Strel'tsova, M.A., Nesterov, A.E., Agafonova, O.A., and Agafonov, A.P. (2001). The use of interferon for emergency prophylaxis of marburg hemorrhagic fever in monkeys. *Bull Exp Biol Med* 132, 686-688.

Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Williams, A.J., Bressler, D.S., Martin, M.L., Swanepoel, R., Burt, F.J., Leman, P.A., Khan, A.S., Rowe, A.K., *et al.* (1999). Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S177-187.

Kunz, C., Hofmann, H., and Aspöck, H. (1968). [Propagation of "Marburg virus" (Vervet monkey disease agent) in *Aedes aegypti*]. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* 208, 347-349.

Le Guenno, B., Formenty, P., and Boesch, C. (1999). Ebola virus outbreaks in the Ivory Coast and Liberia, 1994-1995. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 77-84.

Leroy, E.M., Baize, S., Volchkov, V.E., Fisher-Hoch, S.P., Georges-Courbot, M.C., Lansoud-Soukate, J., Capron, M., Debre, P., McCormick, J.B., and Georges, A.J. (2000). Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet* 355, 2210-2215.

Leroy, E.M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Delicat, A., Paweska, J.T., Gonzalez, J.P., and Swanepoel, R. (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438, 575-576.

Licata, J.M., Johnson, R.F., Han, Z., and Harty, R.N. (2004). Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *Journal of virology* 78, 7344-7351.

Licata, J.M., Simpson-Holley, M., Wright, N.T., Han, Z., Paragas, J., and Harty, R.N. (2003). Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4. *Journal of virology* 77, 1812-1819.

Lin, G., Simmons, G., Pohlmann, S., Baribaud, F., Ni, H., Leslie, G.J., Haggarty, B.S., Bates, P., Weissman, D., Hoxie, J.A., *et al.* (2003). Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of virology* 77, 1337-1346.

Lodish, H.F., and Porter, M. (1980). Heterogeneity of vesicular stomatitis virus particles: implications for virion assembly. *Journal of virology* 33, 52-58.

Lotfering, B., Muhlberger, E., Tamura, T., Klenk, H.D., and Becker, S. (1999). The nucleoprotein of Marburg virus is target for multiple cellular kinases. *Virology* 255, 50-62.

Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Parvin, J.D., and Palese, P. (1989). Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 59, 1107-1113.

Mar'iankova, R.F., Glushakova, S.E., Pyzhik, E.V., and Lukashevich, I.S. (1993). [The penetration of the Marburg virus into eukaryotic cells]. *Vopr Virusol* 38, 74-76.

Martin-Serrano, J., Perez-Caballero, D., and Bieniasz, P.D. (2004). Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *Journal of virology* 78, 5554-5563.

Martinez, M.J., Biedenkopf, N., Volchkova, V., Hartlieb, B., Alazard-Dany, N., Reynard, O., Becker, S., and Volchkov, V. (2008). Role of Ebolavirus Vp30 in Transcription Reinitiation. *Journal of virology* 82, 12569-73.

Martini, G.A. (1973). Marburg virus disease. *Postgrad Med J* 49, 542-546.

Martini, G.A., Knauff, H.G., Schmidt, H.A., Mayer, G., and Baltzer, G. (1968). A hitherto unknown infectious disease contracted from monkeys. "Marburg-virus" disease. *Ger Med Mon* 13, 457-470.

Martini, G.A., and Schmidt, H.A. (1968). [Spermatogenic transmission of the "Marburg virus". (Causes of "Marburg simian disease")]. *Klin Wochenschr* 46, 398-400.

Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Moller, P., Rennekamp, A.J., Krumbiegel, M., Geier, M., Eisemann, J., Turza, N., Saunier, B., *et al.* (2004). DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology* 78, 12090-12095.

Marzi, A., Wegele, A., and Pohlmann, S. (2006). Modulation of virion incorporation of Ebolavirus glycoprotein: effects on attachment, cellular entry and neutralization. *Virology* 352, 345-356.

Matthews, J.C., Hori, K., and Cormier, M.J. (1977). Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry* 16, 85-91.

Mavrakakis, M., Kolesnikova, L., Schoehn, G., Becker, S., and Ruigrok, R.W. (2002). Morphology of Marburg virus NP-RNA. *Virology* 296, 300-307.

Mellquist-Riemenschneider, J.L., Garrison, A.R., Geisbert, J.B., Saikh, K.U., Heidebrink, K.D., Jahrling, P.B., Ulrich, R.G., and Schmaljohn, C.S. (2003). Comparison of the protective efficacy of DNA and baculovirus-derived protein vaccines for EBOLA virus in guinea pigs. *Virus Res* 92, 187-193.

Mittler, E., Kolesnikova, L., Strecker, T., Garten, W., and Becker, S. (2007). Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope. *Journal of virology* 81, 3942-3948.

Modrof, J., Becker, S., and Muhlberger, E. (2003). Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein. *Journal of virology* 77, 3334-3338.

Modrof, J., Moritz, C., Kolesnikova, L., Konakova, T., Hartlieb, B., Randolph, A., Muhlberger, E., and Becker, S. (2001). Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology* 287, 171-182.

Modrof, J., Muhlberger, E., Klenk, H.D., and Becker, S. (2002). Phosphorylation of VP30 impairs ebola virus transcription. *J Biol Chem* 277, 33099-33104.

Moller, P., Pariente, N., Klenk, H.D., and Becker, S. (2005). Homo-oligomerization of Marburgvirus VP35 is essential for its function in replication and transcription. *Journal of virology* 79, 14876-14886.

Monath, T.P. (1999). Ecology of Marburg and Ebola viruses: speculations and directions for future research. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S127-138.

Mottet-Osman, G., Iseni, F., Pelet, T., Wiznerowicz, M., Garcin, D., and Roux, L. (2007). Suppression of the Sendai virus M protein through a novel short interfering RNA approach inhibits viral particle production but does not affect viral RNA synthesis. *Journal of virology* 81, 2861-2868.

Muhlberger, E., Lotfering, B., Klenk, H.D., and Becker, S. (1998). Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *Journal of virology* 72, 8756-8764.

Muhlberger, E., Sanchez, A., Randolph, A., Will, C., Kiley, M.P., Klenk, H.D., and Feldmann, H. (1992). The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. *Virology* 187, 534-547.

Muhlberger, E., Trommer, S., Funke, C., Volchkov, V., Klenk, H.D., and Becker, S. (1996). Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology* 223, 376-380.

Muhlberger, E., Weik, M., Volchkov, V.E., Klenk, H.D., and Becker, S. (1999). Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *Journal of virology* 73, 2333-2342.

Munch, J., Rucker, E., Standker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., *et al.* (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131, 1059-1071.

Ndayimirije, N., and Kindhauser, M.K. (2005). Marburg hemorrhagic fever in Angola--fighting fear and a lethal pathogen. *N Engl J Med* 352, 2155-2157.

Neumann, G., Feldmann, H., Watanabe, S., Lukashevich, I., and Kawaoka, Y. (2002). Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *Journal of virology* 76, 406-410.

Pattnaik, A.K., and Wertz, G.W. (1990). Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs. *Journal of virology* 64, 2948-2957.

Pattnaik, A.K., and Wertz, G.W. (1991). Cells that express all five proteins of vesicular stomatitis virus from cloned cDNAs support replication, assembly, and budding of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1379-1383.

Peters, C.J. (1996). Emerging infections--Ebola and other filoviruses. *West J Med* 164, 36-38.

Peters, C.J. (2005). Marburg and Ebola--arming ourselves against the deadly filoviruses. *N Engl J Med* 352, 2571-2573.

Peters, C.J., and Khan, A.S. (1999). Filovirus diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 85-95.

Petersen, J.M., Her, L.S., Varvel, V., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2000). The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* 20, 8590-8601.

Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., and Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71 (Pt 5), 1153-1162.

Pokhodiaev, V.A., Gonchar, N.I., and Pshenichnov, V.A. (1991). [An experimental study of the contact transmission of the Marburg virus]. *Vopr Virusol* 36, 506-508.

Pourrut, X., Kumulungui, B., Wittmann, T., Moussavou, G., Delicat, A., Yaba, P., Nkoghe, D., Gonzalez, J.P., and Leroy, E.M. (2005). The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes Infect* 7, 1005-1014.

Racaniello, V.R., and Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214, 916-919.

Rao, M., Bray, M., Alving, C.R., Jahrling, P., and Matyas, G.R. (2002). Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4(+) T cells. *Journal of virology* 76, 9176-9185.

Reed, D.S., and Mohamadzadeh, M. (2007). Status and challenges of filovirus vaccines. *Vaccine* 25, 1923-1934.

Reid, S.P., Leung, L.W., Hartman, A.L., Martinez, O., Shaw, M.L., Carbonnelle, C., Volchkov, V.E., Nichol, S.T., and Basler, C.F. (2006). Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *Journal of virology* 80, 5156-5167.

Reid, S.P., Valmas, C., Martinez, O., Sanchez, F.M., and Basler, C.F. (2007). Ebola virus VP24 proteins inhibit the interaction of NPI-1 subfamily karyopherin alpha proteins with activated STAT1. *Journal of virology* 81, 13469-13477.

Reuter, T., Weissbrich, B., Schneider-Schaulies, S., and Schneider-Schaulies, J. (2006). RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *Journal of virology* 80, 5951-5957.

Riemenschneider, J., Garrison, A., Geisbert, J., Jahrling, P., Hevey, M., Negley, D., Schmaljohn, A., Lee, J., Hart, M.K., Vanderzanden, L., *et al.* (2003). Comparison of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine* 21, 4071-4080.

Ruigrok, R.W., Schoehn, G., Dessen, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H.D., and Weissenhorn, W. (2000). Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *Journal of molecular biology* 300, 103-112.

Ruthel, G., Demmin, G.L., Kallstrom, G., Javid, M.P., Badie, S.S., Will, A.B., Nelle, T., Schokman, R., Nguyen, T.L., Carra, J.H., *et al.* (2005). Association of ebola virus matrix protein VP40 with microtubules. *Journal of virology* 79, 4709-4719.

Ryabchikova, E., Kolesnikova, L., Smolina, M., Tkachev, V., Pereboeva, L., Baranova, S., Grazhdantseva, A., and Rassadkin, Y. (1996). Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch Virol* 141, 909-921.

Ryabchikova, E.I., Kolesnikova, L.V., and Netesov, S.V. (1999). Animal pathology of filoviral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 145-173.

Sanchez, A. (2007). Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity. *J Infect Dis* 196 Suppl 2, S251-258.

Sanchez, A., Kiley, M.P., Holloway, B.P., and Auperin, D.D. (1993). Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res* 29, 215-240.

Sanchez, A., Kiley, M.P., Klenk, H.D., and Feldmann, H. (1992). Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negative-strand RNA viruses. *J Gen Virol* 73 (Pt 2), 347-357.

Sanchez, A., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Miranda, M.E., Trappier, S.G., Khan, A.S., Peters, C.J., and Nichol, S.T. (1999). Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S164-169.

Sanchez, A., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Peters, C.J., Nichol, S.T., Khan, A.S., and Mahy, B.W. (1995). Reemergence of Ebola virus in Africa. *Emerg Infect Dis* 1, 96-97.

Sanchez, A., Trappier, S.G., Mahy, B.W., Peters, C.J., and Nichol, S.T. (1996). The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3602-3607.

Sanger, C., Muhlberger, E., Lotfering, B., Klenk, H.D., and Becker, S. (2002). The Marburg virus surface protein GP is phosphorylated at its ectodomain. *Virology* 295, 20-29.

Sanger, F., and Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology* 94, 441-448.

Schibli, D.J., and Weissenhorn, W. (2004). Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion. *Mol Membr Biol* 21, 361-371.

Schmitt, A.P., and Lamb, R.A. (2004). Escaping from the cell: assembly and budding of negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 283, 145-196.

Schnittler, H.J., and Feldmann, H. (1999). Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 175-204.

Schnittler, H.J., Mahner, F., Drenckhahn, D., Klenk, H.D., and Feldmann, H. (1993). Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. *J Clin Invest* 91, 1301-1309.

Shimojima, M., Takada, A., Ebihara, H., Neumann, G., Fujioka, K., Irimura, T., Jones, S., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. (2006). Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *Journal of virology* 80, 10109-10116.

Siegert, R., Shu, H.L., Slenczka, W., Peters, D., and Muller, G. (1967). [On the etiology of an unknown human infection originating from monkeys]. *Dtsch Med Wochenschr* 92, 2341-2343.

Simmons, G., Reeves, J.D., Grogan, C.C., Vandenberghe, L.H., Baribaud, F., Whitbeck, J.C., Burke, E., Buchmeier, M.J., Soilleux, E.J., Riley, J.L., *et al.* (2003a). DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 305, 115-123.

Simmons, G., Rennekamp, A.J., Chai, N., Vandenberghe, L.H., Riley, J.L., and Bates, P. (2003b). Folate receptor alpha and caveolae are not required for Ebola virus glycoprotein-mediated viral infection. *Journal of virology* 77, 13433-13438.

Simpson, D.I. (1977). Marburg fever. *Nurs Mirror* 144, 13-15.

Sinn, P.L., Hickey, M.A., Staber, P.D., Dylla, D.E., Jeffers, S.A., Davidson, B.L., Sanders, D.A., and McCray, P.B., Jr. (2003). Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *Journal of virology* 77, 5902-5910.

Slenczka, W.G. (1999). The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 49-75.

Slenczka, W., M. Rietschel, C. Hoffmann, and W. Sixl. (1984). Seroepidemiologische Untersuchung über Vorkommen von Antikörpern gegen Marburg- und Ebola Virus in Afrika, *Mitt. Oesterr. Ges. Tropenmed. Parasit* 6, 53-60.

Smith, D.H., Johnson, B.K., Isaacson, M., Swanapoel, R., Johnson, K.M., Killey, M., Bagshawe, A., Siongok, T., and Keruga, W.K. (1982). Marburg-virus disease in Kenya. *Lancet* 1, 816-820.

Stroher, U., West, E., Bugany, H., Klenk, H.D., Schnittler, H.J., and Feldmann, H. (2001). Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *Journal of virology* 75, 11025-11033.

Sullivan, N.J., Sanchez, A., Rollin, P.E., Yang, Z.Y., and Nabel, G.J. (2000). Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408, 605-609.

Swanapoel, R., Leman, P.A., Burt, F.J., Zachariades, N.A., Braack, L.E., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Zaki, S.R., and Peters, C.J. (1996). Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis* 2, 321-325.

Swanapoel, R., Smit, S.B., Rollin, P.E., Formenty, P., Leman, P.A., Kemp, A., Burt, F.J., Grobbelaar, A.A., Croft, J., Bausch, D.G., *et al.* (2007). Studies of reservoir hosts for Marburg virus. *Emerg Infect Dis* 13, 1847-1851.

Swenson, D.L., Wang, D., Luo, M., Warfield, K.L., Woraratanadharm, J., Holman, D.H., Dong, J.Y., and Pratt, W.D. (2008a). Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin Vaccine Immunol* 15, 460-467.

Swenson, D.L., Warfield, K.L., Kuehl, K., Larsen, T., Hevey, M.C., Schmaljohn, A., Bavari, S., and Aman, M.J. (2004). Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40, 27-31.

Swenson, D.L., Warfield, K.L., Larsen, T., Alves, D.A., Coberley, S.S., and Bavari, S. (2008b). Monovalent virus-like particle vaccine protects guinea pigs and nonhuman

primates against infection with multiple Marburg viruses. *Expert Rev Vaccines* 7, 417-429.

Swenson, D.L., Warfield, K.L., Negley, D.L., Schmaljohn, A., Aman, M.J., and Bavari, S. (2005). Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* 23, 3033-3042.

Takada, A., Fujioka, K., Tsuiji, M., Morikawa, A., Higashi, N., Ebihara, H., Kobasa, D., Feldmann, H., Irimura, T., and Kawaoka, Y. (2004). Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *Journal of virology* 78, 2943-2947.

Takada, A., and Kawaoka, Y. (2001). The pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Trends Microbiol* 9, 506-511.

Timmins, J., Schoehn, G., Ricard-Blum, S., Scianimanico, S., Vernet, T., Ruigrok, R.W., and Weissenhorn, W. (2003). Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *Journal of molecular biology* 326, 493-502.

Timmins, J., Scianimanico, S., Schoehn, G., and Weissenhorn, W. (2001). Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* 283, 1-6.

Towner, J.S., Khristova, M.L., Sealy, T.K., Vincent, M.J., Erickson, B.R., Bawiec, D.A., Hartman, A.L., Comer, J.A., Zaki, S.R., Stroher, U., *et al.* (2006). Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *Journal of virology* 80, 6497-6516.

Towner, J.S., Pourrut, X., Albarino, C.G., Nkogue, C.N., Bird, B.H., Grard, G., Ksiazek, T.G., Gonzalez, J.P., Nichol, S.T., and Leroy, E.M. (2007). Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS ONE* 2, e764.

Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J. (2007). Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *Journal of virology* 81, 4895-4899.

Villinger, F., Rollin, P.E., Brar, S.S., Chikkala, N.F., Winter, J., Sundstrom, J.B., Zaki, S.R., Swanepoel, R., Ansari, A.A., and Peters, C.J. (1999). Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S188-191.

Volchkov, V.E., Becker, S., Volchkova, V.A., Ternovoj, V.A., Kotov, A.N., Netesov, S.V., and Klenk, H.D. (1995). GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology* 214, 421-430.

Volchkov, V.E., Chepurinov, A.A., Volchkova, V.A., Ternovoj, V.A., and Klenk, H.D. (2000a). Molecular characterization of guinea pig-adapted variants of Ebola virus. *Virology* 277, 147-155.

Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Chepurinov, A.A., Blinov, V.M., Dolnik, O., Netesov, S.V., and Feldmann, H. (1999). Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* 80 (Pt 2), 355-362.

Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Muhlberger, E., Kolesnikova, L.V., Weik, M., Dolnik, O., and Klenk, H.D. (2001). Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* 291, 1965-1969.

Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Stroher, U., Becker, S., Dolnik, O., Cieplik, M., Garten, W., Klenk, H.D., and Feldmann, H. (2000b). Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology* 268, 1-6.

Volchkova, V.A., Feldmann, H., Klenk, H.D., and Volchkov, V.E. (1998). The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. *Virology* 250, 408-414.

Wang, D., Hevey, M., Juompan, L.Y., Trubey, C.M., Raja, N.U., Deitz, S.B., Woraratanadharm, J., Luo, M., Yu, H., Swain, B.M., *et al.* (2006a). Complex adenovirus-vectored vaccine protects guinea pigs from three strains of Marburg virus challenges. *Virology* 353, 324-332.

Wang, D., Schmaljohn, A.L., Raja, N.U., Trubey, C.M., Juompan, L.Y., Luo, M., Deitz, S.B., Yu, H., Woraratanadharm, J., Holman, D.H., *et al.* (2006b). De novo syntheses of Marburg virus antigens from adenovirus vectors induce potent humoral and cellular immune responses. *Vaccine* 24, 2975-2986.

Warfield, K.L., Bosio, C.M., Welcher, B.C., Deal, E.M., Mohamadzadeh, M., Schmaljohn, A., Aman, M.J., and Bavari, S. (2003). Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15889-15894.

Warfield, K.L., Swenson, D.L., Demmin, G., and Bavari, S. (2005). Filovirus-like particles as vaccines and discovery tools. *Expert Rev Vaccines* 4, 429-440.

Warfield, K.L., Swenson, D.L., Negley, D.L., Schmaljohn, A.L., Aman, M.J., and Bavari, S. (2004). Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine* 22, 3495-3502.

Watanabe, S., Noda, T., Halfmann, P., Jasenosky, L., and Kawaoka, Y. (2007). Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome. *J Infect Dis* 196 Suppl 2, S284-290.

Watanabe, S., Watanabe, T., Noda, T., Takada, A., Feldmann, H., Jasenosky, L.D., and Kawaoka, Y. (2004). Production of novel ebola virus-like particles from cDNAs: an alternative to ebola virus generation by reverse genetics. *Journal of virology* 78, 999-1005.

Weik, M., Enterlein, S., Schlenz, K., and Muhlberger, E. (2005). The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six. *Journal of virology* 79, 10660-10671.

Weik, M., Modrof, J., Klenk, H.D., Becker, S., and Muhlberger, E. (2002). Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *Journal of virology* 76, 8532-8539.

White, R.J., and Phillips, D.R. (1988). Transcriptional analysis of multisite drug-DNA dissociation kinetics: delayed termination of transcription by actinomycin D. *Biochemistry* 27, 9122-9132.

WHO, <http://www.who.int/csr/disease/marburg/factsheet/en/index.html> /
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/index1.html>

Will, C., Muhlberger, E., Linder, D., Slenczka, W., Klenk, H.D., and Feldmann, H. (1993). Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. *Journal of virology* 67, 1203-1210.

Wilson, J.A., Bray, M., Bakken, R., and Hart, M.K. (2001). Vaccine potential of Ebola virus VP24, VP30, VP35, and VP40 proteins. *Virology* 286, 384-390.

Wood, K.V., de Wet, J.R., Dewji, N., and DeLuca, M. (1984). Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun* 124, 592-596.

Wool-Lewis, R.J., and Bates, P. (1998). Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *Journal of virology* 72, 3155-3160.

Yang, Z.Y., Duckers, H.J., Sullivan, N.J., Sanchez, A., Nabel, E.G., and Nabel, G.J. (2000). Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat Med* 6, 886-889.

Yuan, H., Puckett, S., and Lyles, D.S. (2001). Inhibition of host transcription by vesicular stomatitis virus involves a novel mechanism that is independent of phosphorylation of TATA-binding protein (TBP) or association of TBP with TBP-associated factor subunits. *Journal of virology* 75, 4453-4458.

Zaki, S.R., Peters C.J. (1997). *Viral Hemorrhagic Fever. Diagnostic Pathology of Infectious Diseases* Appleton and Lange, Stamford, USA, 347-364.

8 Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1.1	Gemeldete Fälle und Ausbrüche von humanen Marburg und Ebola Virus Infektionen.	3
Abb. 1.2	Struktur des Marburg Virus.	9
Abb. 1.3	Schematische Übersicht über das iVLP-System.	16
Abb. 3.1	Prinzip einer PCR.	30
Abb. 3.2	Prinzip der rekombinanten PCR.	39
Abb. 3.3	Übersicht der Renilla und Firefly-Luziferase Reaktion.	56
Abb. 4.1	Überprüfung der Expression und Funktionalität der MARV-Expressionsplasmide.	60
Abb. 4.2	Genomaufbau des Marburg Virus und des Minigenoms 3M-5M luc.	63
Abb. 4.3	Einfluss des Nukleoproteins NP auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.	65
Abb. 4.4	Einfluss der Polymerase L auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.	67
Abb. 4.5	Einfluss des Polymerasekofaktors VP35 auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.	69
Abb. 4.6	Einfluss des Nukleokapsidproteins VP30 auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.	71
Abb. 4.7	Einfluss des Matrixproteins VP40 auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.	74
Abb. 4.8	Einfluss des Matrixproteins VP24 auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.	75
Abb. 4.9	Einfluss des Oberflächenproteins GP auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.	78
Abb. 4.10	Einfluss des Minigenoms 3M-5M luc auf die Transkription, Partikelformation und Infektion.	79
Abb. 4.11	Vergleich der Proteinverhältnisse im Marburg Virus und iVLP.	81
Abb. 4.12	Unterscheidung sphärischer und filamentöser Partikel.	83
Abb. 4.13	Inhibition von viraler und zellulärer Transkription durch VP40 .	87
Abb. 4.14	Einfluss von VP24 und VP30 auf die zelluläre Transkription.	89
Abb. 4.15	Einfluss von VP40 auf die virale Replikation.	91
Abb. 4.16	Bestimmung der minimalen infektiösen Dosis.	93
Abb. 4.17	Analyse eines neutralisierenden Serums.	95
Abb. 4.18	Einfluss von Peptiden aus menschlichem Samen auf die Infektion mit iVLPs.	97
Abb. 4.19	Spezifität der Infektionssteigerung durch SEVI.	98
Abb. 4.20	Einfluss von Samen und Samenflüssigkeit auf die EBOV iVLP Infektion.	100
Abb. 4.21	Einfluss von Carbocyclic-3-deaza Adenosin, 3-deaza-Neplanocin A, Interferon und Ribavirin auf die Infektion mit iVLPs.	102

9 Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil aufgeführt.

α	anti
aa	Aminosäure
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
ASGP-R	Asialoglykoproteinrezeptor
bp	Basenpaare
BSL	„biosafety level“
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CDC	Centers for Disease Control (Atlanta/USA)
CEBOV	Ivory Coast Ebola Virus
C-Terminus	Carboxyterminus
DC-SIGN	“dendritic cell-specific intercellular adhesion
DC-SIGNR	“dendritic cell-specific intercellular adhesion
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2’ -Desoxynukleosidtriphosphat
EBOV	Ebola Virus
FCS	fetales Kälberserum
FR-alpha	Folatrezeptor alpha
GP	Glykoprotein
h	Stunden
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytial Virus
IFN	Interferon
IRF-3	Interferon Regulatorischen Faktors 3
iVLP	“infectious virus-like particles” = infektiöse Virus-ähnliche Partikel
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L-Protein	Large-Protein (Polymerase)
MARV	Marburg Virus
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
Mock	Scheininfection

moi	“multiplicity of infection“
MPS	monozytäres phagozytisches System
mRNA	messenger RNA
MVB	“multi vesicular bodies“ = multivesikuläre Strukturen
N/NP	Nukleoprotein
Nedd4	“neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4“
N-Terminus	Aminotерminus
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
P	Phosphoprotein
P/S	Penicillin/Streptomycin
P0 / P1	Passage 0 / Passage 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	sauren Prostata-Phosphatase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POD	Peroxidase
REBOV	Reston Ebola Virus
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
S1	Sicherheitstufe 1
SEBOV	Sudan Ebola Virus
sec	Sekunden
SEVI	„Semen-derived Enhancer of Virus Infection“
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TFIID	Transkriptionsfaktor II D
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
U	“unit“ = Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEE	Venezuelan-equine-Encephalitis
VLP	“virus-like particles“ = Virus-ähnliche Partikel
VP	Virusprotein
vRNA	virale RNA
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus
VT	Volumenteil
w/v	weight per volume
WHO	World Health Organisation
ZEBOV	Zaire Ebola Virus